

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1978 - N° 155

THÈSE

présentée

A l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 17 Novembre 1978

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques

par

MAIRE Irène, née KÖNIGSBERG

née le 25 Août 1945

à LYON

**Les alpha D mannosidases acides
humaines - Etude chez des sujets sains
ou atteints de mannosidose
Application au diagnostic prénatal**

JURY : M. COTTE

M. DREYFUS

M. LATURAZE

M. COLLOMBEL

M. HIRSCHHORN

M^{lle} MATHIEU

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1972 - 1973

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie

en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

par le Docteur en Pharmacie, Monsieur, Philippe BOUTIER

CHAIRS VIDE DE KONVULSION

du 15 au 25 Mars 1973

à LYON

Les alpha D mannosidases acides
humaines - Etude chez des sujets sains
ou atteints de mannosidose
Application au diagnostic prénatal

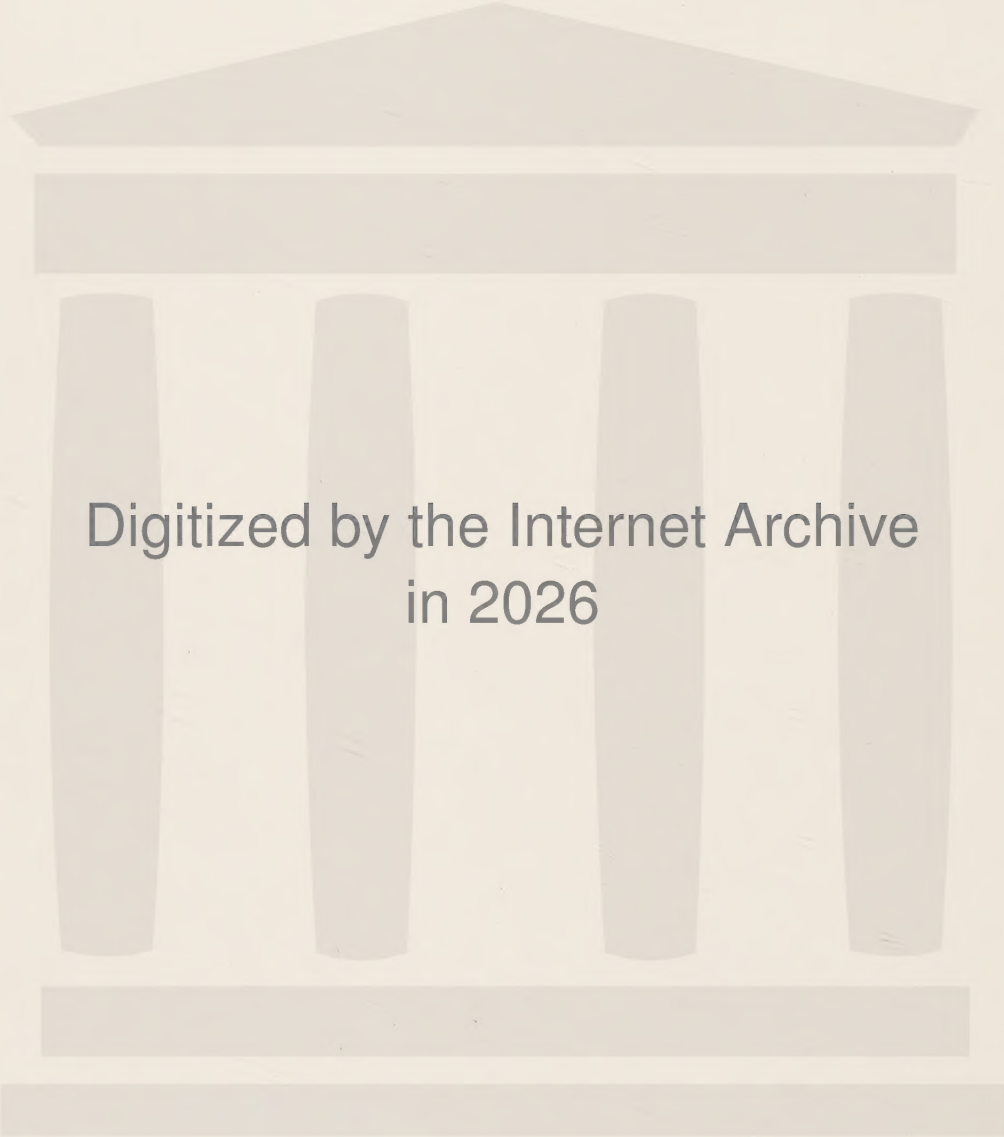
Pr. J. BOUTIER

Dr. J. BOUTIER

Dr. L. BOUTIER

Dr. J. BOUTIER

Dr. J. BOUTIER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554217_0001

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1978 - N°

THÈSE

présentée

A l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie
et soutenue publiquement le 17 Novembre 1978
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques

par

MAIRE Irène, née KÖNIGSBERG

née le 25 Août 1945

à LYON

**Les alpha D mannosidases acides
humaines - Etude chez des sujets sains
ou atteints de mannosidose
Application au diagnostic prénatal**

JURY : M. COTTE
M. DREYFUS
M. LATURAZE
M. COLLOMBEL
M. HIRSCHHORN
M^{lle} MATHIEU



Les alphas D mannosidases acides
humaines - Etude chez des sujets sains
ou atteints de mannosidose
Application au diagnostic prénatal

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD, Administrateur Civil

DIRECTEURS DES UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

U.E.R. de MEDECINE GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de MEDECINE LYON-NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. des SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Monsieur le Pr Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. de TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de Sciences Odontologiques : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de MATHEMATIQUES : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de PHYSIQUE : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de CHIMIE-BIOCHIMIE : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. de SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. de SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Pr Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. de PHYSIQUE-NUCLEAIRE : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. n° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. n° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. de MECANIQUE : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT.

A Bernard,

A Sophie et Céline

Avec tout mon amour.

A mes parents

Qui m'ont toujours prodigué leurs encouragements au cours
de mes études, avec toute mon affection.

A mes beaux parents

En témoignage d'affection.

A ma soeur et mon beau frère.

A mon beau frère et ma belle soeur.

A ma grand mère.

A tous mes amis.

A notre maître et Président de thèse.

Monsieur le Professeur J. COTTE

Il nous a fait le très grand honneur d'accepter de présider notre thèse.

Nous lui devons notre premier contact avec l'hôpital et nous avons passé dans son laboratoire la plus grande partie de notre internat.

Il a toujours su faire naître l'enthousiasme, la discussion fructueuse et entretenir la confiance. Nous sommes fière de compter parmi ses élèves.

Nous le remercions des fonctions qu'il a bien voulu nous confier et le prions d'accepter l'assurance de notre respectueux attachement et de toute notre reconnaissance.

A nos juges,

Monsieur le Professeur LATURAZE

Nous lui sommes reconnaissante de l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé.

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'être notre juge et l'assurons de notre respectueux dévouement.

Monsieur le Professeur COLLOMBEL

Nous lui devons de nous être engagée dans la voie de la biologie hospitalière. Au cours des années de notre internat, nous avons pu apprécier l'ampleur de ses connaissances et son extrême disponibilité.

Par la suite, il nous a toujours témoigné intérêt et amitié.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère et respectueux attachement.

Monsieur le Professeur DREYFUS

Nous connaissons sa compétence dans le domaine des maladies de surcharge lysosomiale.

Nous lui sommes donc particulièrement reconnaissante d'avoir accepté de nous juger et l'assurons de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur HIRSCHHORN

Nous avons été impressionnée par l'étendue et la précision de ses connaissances ainsi que par son extraordinaire simplicité.

Nous le remercions d'avoir accepté de compter parmi nos juges en dépit de l'importance de ses charges.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre admiration et de notre gratitude.

Mademoiselle Monique MATHIEU

Elle nous a donné le goût de l'enzymologie. Elle a su nous guider nous conseiller, et nous soutenir dans la réalisation de cette thèse et nous lui devons le meilleur de ce travail.

Nous avons pu à cette occasion plus que jamais apprécier sa grande disponibilité et nous lui sommes reconnaissante de l'accueil chaleureux qu'elle a toujours manifesté à notre égard.

Qu'elle trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre sincère amitié.

A tous ceux qui nous ont aidée dans l'élaboration de ce travail.

A monsieur le Professeur LOUISOT

Malgré la lourdeur de ses charges, il nous a reçue et conseillée à l'occasion de cette thèse et nous a permis de réaliser chez lui une partie de notre travail.

Nous le prions d'accepter nos sincères remerciements.

A monsieur le Docteur H. CARRIER et Madame le Docteur J. GILLY

Qui ont réalisé les études anatomo pathologiques.

A monsieur le Docteur Ch. MERIEUX et Monsieur le Docteur LIAUTAUD

qui ont aimablement mis à notre disposition les placentas nécessaires à la purification de l'enzyme.

A Monsieur le Professeur M. HERMIER et monsieur le Docteur J. DALERY

qui ont bien voulu nous confier l'étude enzymologique de leurs malades.

A Marie-Thérèse ZABOT et Ginette MANDON

qui ont réalisé toutes les cultures de cellules nécessaires à notre étude.

A Jacques MAILLARDET

qui n'a pas hésité, par simple amitié, à sacrifier des soirées entières pour nous aider.

A Françoise CHEVALIER et Anne Marie BONARDOT

Pour leur collaboration efficace et agréable.

A Martine ANNAT

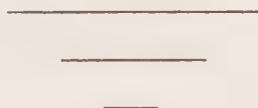
qui a permis l'impression de ce travail.

A Claude DORCHE et Marie-Odile ROLLAND

Pour leurs conseils amicaux

A tous les Adjoints , Assistants et Attachés du laboratoire de
L'hôpital DEBROUSSE.

LES ALPHA D MANNOSIDASES ACIDES HUMAINES
ETUDE CHEZ DES SUJETS SAINS OU ATTEINTS DE MANNOSIDOSE
APPLICATION AU DIAGNOSTIC PRENATAL



SIGNIFICATION DES ABREVIATIONS EMPLOYEES

AMP	= Adénosine monophosphate
Asn	= Asparagine
CM cellulose	= Carboxymethyl cellulose
DEAE Cellulose	= diéthylaminoéthylcellulose
Dol	= Dolichol
Dol.P.	= Dolichol phosphate
Dol.P.P.	= Dolichol pyrophosphate
EDTA	= Ethylène diamino tétracétique acide
Fuc	= Fucose
GDP	= Guanosine diphosphate
GERL	= Golgi endoplasmic reticulum lysosome
Glc NAc	= N-acétyl glucosamine
GMP	= guanosine monophosphate
Ig	= Immunoglobulines
Km	= constante de Michaelis
LCR	= liquide céphalo rachidien
Man	= Mannose
Manp	= Mannopyranoside
mM	= millimolaire
MPS	= mucopolysaccharides, glycosaminoglycanes
MU	= 4 méthylumbelliféryl
PAS	= Periodique Acide Schiff
pI	= point isoélectrique
PM	= poids moléculaire
(S)	= concentration en substrat
Ser	= Sérine
Thr	= Thréonine
UDP	= Uridine diphosphate
UMP	= Uridine monophosphate
V _m	= Vitesse maximale

INTRODUCTION

La mannosidose est une maladie de surcharge lysosomiale assez récemment décrite puisque le premier cas en a été individualisé en 1967 par OCKERMAN (223). Depuis lors, nous avons repertorié 64 cas dans la littérature dont 53 au cours des 3 dernières années, mais les résultats rapportés à propos de l'anomalie enzymatique responsable étaient parfois contradictoires. Il nous a paru intéressant à propos de 4 cas (dans deux familles) d'approfondir cette étude enzymatique.

Le présent travail rapporte nos résultats de l'étude de l'alpha D-mannosidase normale dans divers milieux biologiques (sérum, leucocytes, fibroblastes et leur milieu de culture, liquides et cellules amniotiques, placenta, foie) : propriétés cinétiques, influence de différents effecteurs, comportement électrophoretique et détermination du point isoélectrique. Ces expériences ont été réalisées sur l'alpha mannosidase au sein des divers milieux et après purification. Les mêmes études ont été réalisées comparativement sur l'enzyme mutante pour essayer de comprendre l'anomalie enzymatique à l'origine de la mannosidose.

La compréhension de cette maladie fait appel à un certain nombre de connaissances relativement récentes concernant la structure et le catabolisme des glycoprotéines et le concept actuel de maladies de surcharge lysosomiale. Dans la première partie de ce travail, nous rappelons :

- le métabolisme des glycoprotéines
- les connaissances sur l'alpha mannosidase
- et quelques éléments sur le fonctionnement normal du lysosome.

Puis nous envisageons la mannosidose en tant qu'anomalie du catabolisme des glycoprotéines, et nous essayons, à la lumière de nos cas et de ceux de la littérature, de dégager les caractéristiques communes de cette maladie sur le plan clinique, paraclinique et biologique.

Dans la deuxième partie, nous décrivons le matériel et les méthodes d'étude utilisées, puis nous exposons nos résultats, nous les discutons comparativement aux autres études et nous essayons d'en tirer des hypothèses sur la nature de la mutation.

PREMIERE PARTIE

LA MANNOSIDASE NORMALE ET MUTANTE
DANS LE CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES

INDIVIDUALISATION DE LA MANNOSIDOSE
AU SEIN DES GLYCOPROTEINOSES

1 - Individualisation de la maladie

La mannosidose fut caractérisée pour la première fois par OCKERMAN en 1967 comme étant une "maladie de surcharge généralisée ressemblant au syndrome de HURLER" (223). Sur le plan biochimique toutefois (224), la maladie différait nettement de la mucopolysaccharidose de type I :

- Au niveau hépatique, OCKERMAN notait une augmentation d'activité de plusieurs hydrolases acides dont la bêta-galactosidase qui est partiellement inhibée par les mucopolysaccharides en excès dans la maladie de HURLER ; il observait au contraire un effondrement de l'activité de l'alpha-D-mannosidase acide, non seulement au niveau hépatique, mais aussi au niveau de la rate et du cortex cérébral.

- Histologiquement (158 - 231), il existait une surcharge en substances qui n'étaient pas des mucopolysaccharides acides.

- Enfin, l'étude de quelques sucres dans des hydrolysats de foie montrait une augmentation du mannose total, le galactose, le glucose et le ribose se retrouvant à des taux comparables à ceux du témoin ; il existait également une surcharge cérébrale en oligosaccharides (227-228).

Depuis cette date, plus de 60 cas ont été répertoriés (nous les passerons en revue ultérieurement).

2 - Classification des Glycoprotéinoses.

Lors de l'établissement d'une "Nomenclature Internationale des Maladies Osseuses Constitutionnelles" (151), il fut proposé de désigner les maladies à symptomatologie proche des mucopolysaccharidoses mais présentant une excrétion normale des mucopolysaccharides urinaires, par le terme de MUCOLIPIDOSES. Cette dénomination est extrêmement criticable , en effet :

- dans toutes ces maladies, la surcharge mixte lipidique et mucopolysaccharidique n'est pas prouvée.

- d'autre part, il existe dans des mucopolysaccharidoses des surcharges en gangliosides au niveau cérébral et dans des sphingolipidoses des surcharges en mucopolysaccharides au niveau viscéral.

En réalité, ces mucolipidoses constituent, et cela dans l'esprit même des auteurs, une sorte de "groupe poubelle", extrêmement hétérogène, qu'il convient de démanteler au fur et à mesure que l'étiologie de ces différentes maladies se précise.

MAROTEAUX et HUMBEL ont suggéré d'éliminer de l'ensemble de ce groupe d'attente les OLIGOSACCHARIDOSES qu'ils caractérisent par une excrétion accrue des oligosaccharides urinaires. Toutefois, stricto sensu, l'asparaginyलग्लुко- saminurie échappe à cette définition.

NEUFELD (214) et STRECKER (294) préfèrent considérer ces maladies comme le résultat d'anomalies du métabolisme des glycoprotéines et les désignent donc par le terme de GLYCOPROTEINOSES (par analogie aux sphingolipidoses ou aux mucopolysaccharidoses). L'étude des composés excrétés dans les urines de ces malades permet de rattacher les glycoprotéinoses décrites jusqu'ici à une anomalie du catabolisme des glycoprotéines à liaison N-acetyl glucosaminyl-asparagine (294).

CLASSIFICATION DES GLYCOPROTEINOSES

Nous adopterons celle proposée par STRECKER (294). Il convient toutefois de signaler que l'interprétation du déficit en neuraminidase dans les sialidoses de type A est encore discutée (323-324).

- Les Sialidoses :

Elles sont caractérisées par l'accumulation et l'excrétion urinaire accrue de sialosides. Deux types semblent se dégager,

- . le type A comprend la mucopolidose de type II (ou "I. Cell Disease") et la mucopolidose de type III. Il est caractérisé par l'augmentation de certaines hydrolases dans le sérum et leur diminution concomittante dans les fibroblastes cutanés en culture ainsi que par une augmentation modérée des sialosides urinaires. Les dernières études semblent mettre en cause des anomalies des sites de reconnaissance communs à plusieurs hydrolases acides (215-324) aboutissant à une localisation inappropriée de ces hydrolases.
- . le type B est caractérisé par des activités normales des hydrolases acides dans le sérum et les fibroblastes à l'exception de l'activité alpha neuraminidasique qui est diminuée ou absente ainsi que par une élimination urinaire massive de sialyloligosaccharides. Il comprend la mucopolidose de type I (282-283-285) et diverses observations encore isolées (154-294).

- La Fucosidose :

Elle se définit par un déficit en alpha-L-fucosidase et par l'accumulation de fucosides dont la nature dépend des phénotypes A, B, H, Lewis et sécrèteur.

- La Mannosidose :

Elle est due à un déficit en alpha-D-mannosidase qui conduit à l'accumulation de mannosides.

- L'Asparaginyll glucosaminurie :

Elle résulte du déficit en 4-L-aspartyl Beta glucosylamine amido hydrolase , aboutissant à l'accumulation d'asparaginyllglucosamine.

- Les maladies qui sont à la fois des Glycoprotéinoses et des Sphingolipidoses :

Ce sont :

. La gangliosidose à GM1 : le déficit en Beta-galactosidase acide entraîne, en dehors de l'accumulation de ganglioside GM1 (au niveau cérébral surtout), et de mucopolysaccharides (au niveau hépatique), une surcharge tissulaire et une excretion urinaire accrue en oligosaccharides.

. La gangliosidose à GM2 variant O ou maladie de SANDHOFF : le déficit des beta-hexosaminidases A et B provoque l'accumulation de gangliosides GM2, de globosides mais aussi d'oligosaccharides (par contre, la maladie de Tay-Sachs est une sphingolipidose pure et n'appartient pas au groupe des glycoprotéinoses).

Nous replacerons plus loin ces diverses maladies dans le catabolisme des glycoprotéines de type lactosaminique.

I - LA MANNOSIDASE ET LE METABOLISME DES GLYCOPROTEINES

I.1. - LES GLYCOPROTEINES

I.1.1. - Définition

La plupart des auteurs admettent la définition proposée en 1962 par GOTTSCHALK (96) : les glycoprotéines sont des hétéroprotéines ayant pour groupe(s) prosthetique(s) une ou plusieurs chaines glucidiques généralement ramifiées, contenant un petit nombre de résidus osidiques et ne présentant pas d'unités répétitives ; ces courtes chaines glucidiques sont fixées latéralement ou à l'extrémité de la chaine polypeptidique par des liaisons covalentes solides.

La contribution de la partie glucidique est très variable : de 5 à 40 %.

I.1.2. - Localisation et rôle des glycoprotéines dans l'organisme (31- 97 - 175 - 176)

Les glycoprotéines se retrouvent partout dans l'organisme, dans le secteur intra et extracellulaire, dans tous les organes, dans tous les fluides et sécrétions et aussi dans toutes les fonctions (hormones, enzymes, lubrifiants, anticorps, transporteurs...).

Nous citerons à titre d'exemple chez l'homme :

- les glycoprotéines plasmatiques (orosomucoïde, immunoglobulines, fétuine, alpha-1-glycoprotéine acide, transferine, haptoglobuline.....), urinaires (glycoprotéine de Tam et Horsfall...)

- les glycoprotéines des sécrétions bronchiques, du sperme, du mucus cervical, du liquide amniotique, du liquide synovial, du liquide cephalo-rachidien du liquide pleural, de la sueur, du lait...

- les glycoprotéines hormonales (thyroglobuline, gonadotrophine chorionique...)
- les glycoprotéines enzymatiques (ribonuclease, hydrolases acides lysosomiales, lactase...)
- les glycoprotéines du tissu conjonctif
- les glycoprotéines des membranes (116) qui jouent des rôles importants et divers dans les phénomènes immunitaires, le contrôle de la croissance cellulaire, les systèmes de récepteurs (pour les virus, molécules diverses...).
- les glycoprotéines cérébrales (30)

I.1.3. - Structure (160 - 175 - 204)

De nombreuses méthodes ont été mises en oeuvre pour étudier les séquences oligosaccharidiques, les conformations des sucres, les liaisons entre la chaîne peptidique et la chaîne glucidique (175 - 204)

a) les constituants glucidiques.

Les principaux constituants glucidiques sont des oses (D-xylose, D-Galactose, D-mannose et beaucoup plus rarement D-glucose et D-fructose), des desoxyoses (L rhamnose et L fucose), des hexosamines (D-glucosamine et D-galactosamine) souvent N-acétylées et des acides sialiques (acide N-acétylneuraminique surtout mais aussi N-glycolylneuraminique, N glycolyl O -diacetylneuraminique...). Les divers acides sialiques occupent dans la chaîne oligosaccharidique des glycoprotéines une position le plus souvent terminale qui laisse libre leur fonction carboxylique : cette fonction acide libre confère aux glycoprotéines leur caractère acide fort et explique leurs propriétés physico-chimiques différentes de celles des autres protéines :

- point isoélectrique plus bas
- solubilité plus grande à pH neutre
- migration plus anodique à l'électrophorèse.

La combinaison de diverses méthodes d'analyse (175-204) permet de connaître la séquence de ces courtes chaînes branchées dont les extrémités sont surtout représentées par l'acide N-acétylneuraminique, mais aussi par le fucose ; le mannose, lui, se situe à peu près exclusivement à l'intérieur de la chaîne oligosaccharidique.

b) les modes de liaison entre les chaînes oligosaccharidiques et la chaîne protéique (160-175).

Divers types de liaison peuvent être envisagés :

- une liaison o.glycosidique entre la fonction réductrice libre de l'ose terminal et la fonction alcool d'une molécule de sérine ou de thréonine,

- une liaison N-glycosidique entre la fonction réductrice libre de l'ose terminal et la fonction amide d'un aminoacide comme la glutamine ou l'asparagine,

- une liaison glycosidique-ester entre la fonction réductrice libre de l'ose terminal et la fonction acide libre d'un amino acide dicarboxylique,

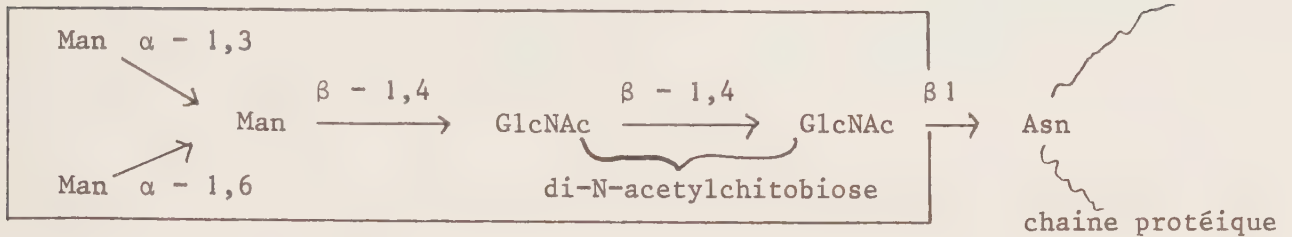
- une liaison peptidoïde entre la fonction amine primaire d'une osamine et la fonction libre d'un amino acide diacide.

Malgré la diversité des séquences glucidiques généralement branchées, fixées sur la chaîne protéique, un certain nombre d'analogies apparaissent entre ces séquences au niveau des zones profondes où se fait l'union avec la chaîne polypeptidique.

Nous nous limiterons à l'exemple des glycoprotéines à liaison N-glycosidique entre la fonction réductrice libre de la N-acetylglucosamine et la fonction amide de l'asparagine (160-204-294). En effet, c'est le catabolisme perturbé de ce type de glycoprotéines qui explique bien la présence des produits de surcharge retrouvés dans la mannosidose.

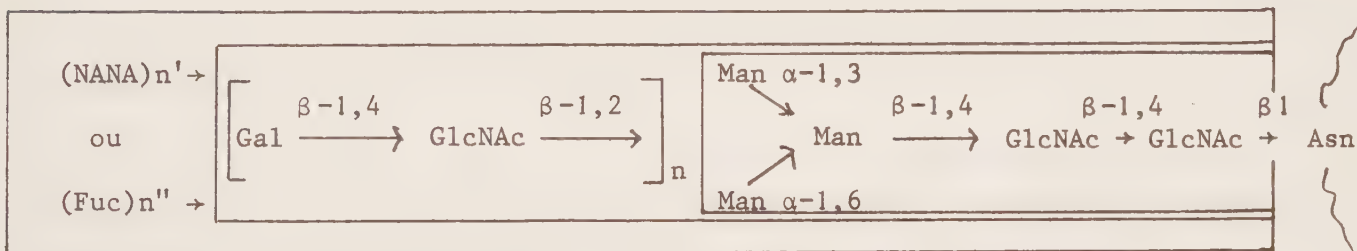
MONTREUIL (204) a démontré dans ces molécules la présence d'une séquence oligosaccharidique interne commune à plus de 40 glycoprotéines :

le pentasaccharide mannotriosido di-N-acetyl chitobiose.



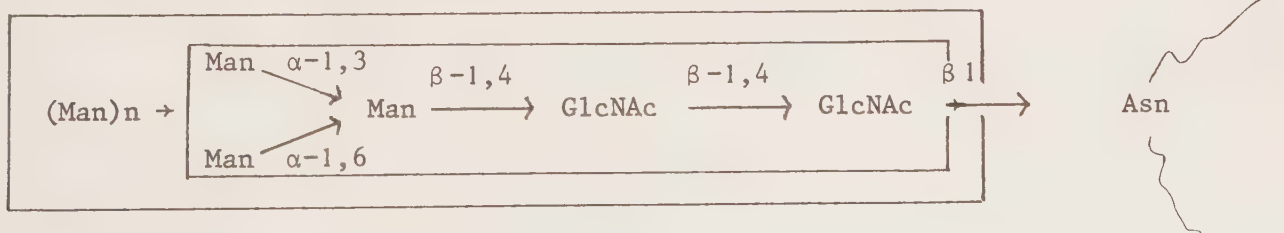
A partir de ce groupe, il distingue 2 sous-groupes :

- les isoglycannes de type N-acetyllactosamine



Chez l'homme, les IgE, la transferrine, la lactotransferrine et l'orosomucoïde appartiennent à cette catégorie.

- Les isoglycannes de type oligomannosidique



La gamma M immunoglobuline humaine est un exemple de ces manannes.

La place des branchements glycannes dans la séquence protéique (175-190)
est encore mal connue et controversée : les résidus asparaginyls portant une chaîne glycanique appartiennent à une séquence :

-Asn - x - Thr (ou Ser)-

 (x étant un aminoacide quelconque)

Cette séquence est nécessaire à la glycosylation, mais sa présence n'est pas une condition suffisante à la réalisation de cette glycosylation (cette séquence intervient en effet dans des glycoprotéines dépourvues de résidus glucidiques).

c) Stéréochimie des glycoprotéines (174-175-204)

L'organisation spatiale des glycoprotéines est mal élucidée, mais il est certain qu'elle permet d'expliquer de nombreux phénomènes : les réactions antigène-anticorps, les contacts intercellulaires membranaires...

MONTREUIL par des méthodes biochimiques et LOUCHEUX par des méthodes biophysiques, ont abouti tous deux à une représentation compatible des glycoprotéines : les chaînes isoglycanniques seraient (à l'exception de la zone profonde mannotriosidochitobiose) des "antennes" placées sur le noyau de la glycoprotéine.

d) La microhétérogénéité des glycoprotéines (175-190-204)

Elle résulte de différences dans la structure d'un ou plusieurs résidus glucidiques attachés en position spécifique sur la chaîne polypeptidique :

- le nombre d'antennes sialyl N-acetyl lactosamines ou oligomannosides fixées sur le schéma pentasaccharidique de base peut varier.

- des glycoprotéines lactosaminiques ou oligomannosidiques peuvent différer par la nature et le nombre des résidus osidiques terminaux.

- de plus, des glycoprotéines de même structure de base et de même nombre d'antennes, terminées par les mêmes résidus N-acetylneuraminique, pourront différer car l'acide N-acetylneuraminique pourra se fixer sur chaque galactose par une liaison α -(2, 2), α -(2, 3), α -(2, 4), α -(2, 6) ce qui conduit à un grand nombre de positions spatiales différentes de l'acide sialique.

- des glycoprotéines peuvent présenter un nombre de groupements isoglycanniques différents sur une même protéine.

- enfin, les positions relatives de ces groupes isoglycanniques sur la protéine (= leur distance) peut être également un facteur de microhétérogénéité de même que leurs orientations spatiales.

I.1.4. - Biosynthèse des glycoprotéines

(16-53-105-164-204-261-279-327-333)

Nous ne ferons qu'aborder ce problème difficile puisque les glycoprotéinoses représentent une anomalie du catabolisme des glycoprotéines normales dont la synthèse n'est pas en cause. Toutefois, les hydrolases acides sont des glycoprotéines et sont donc synthétisées comme telles.

La synthèse de la partie protéique se fait classiquement au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux. Les processus de glycosylation par contre, soulèvent beaucoup de problèmes tant en ce qui concerne les mécanismes réactionnels que la localisation intracellulaire de leur réalisation.

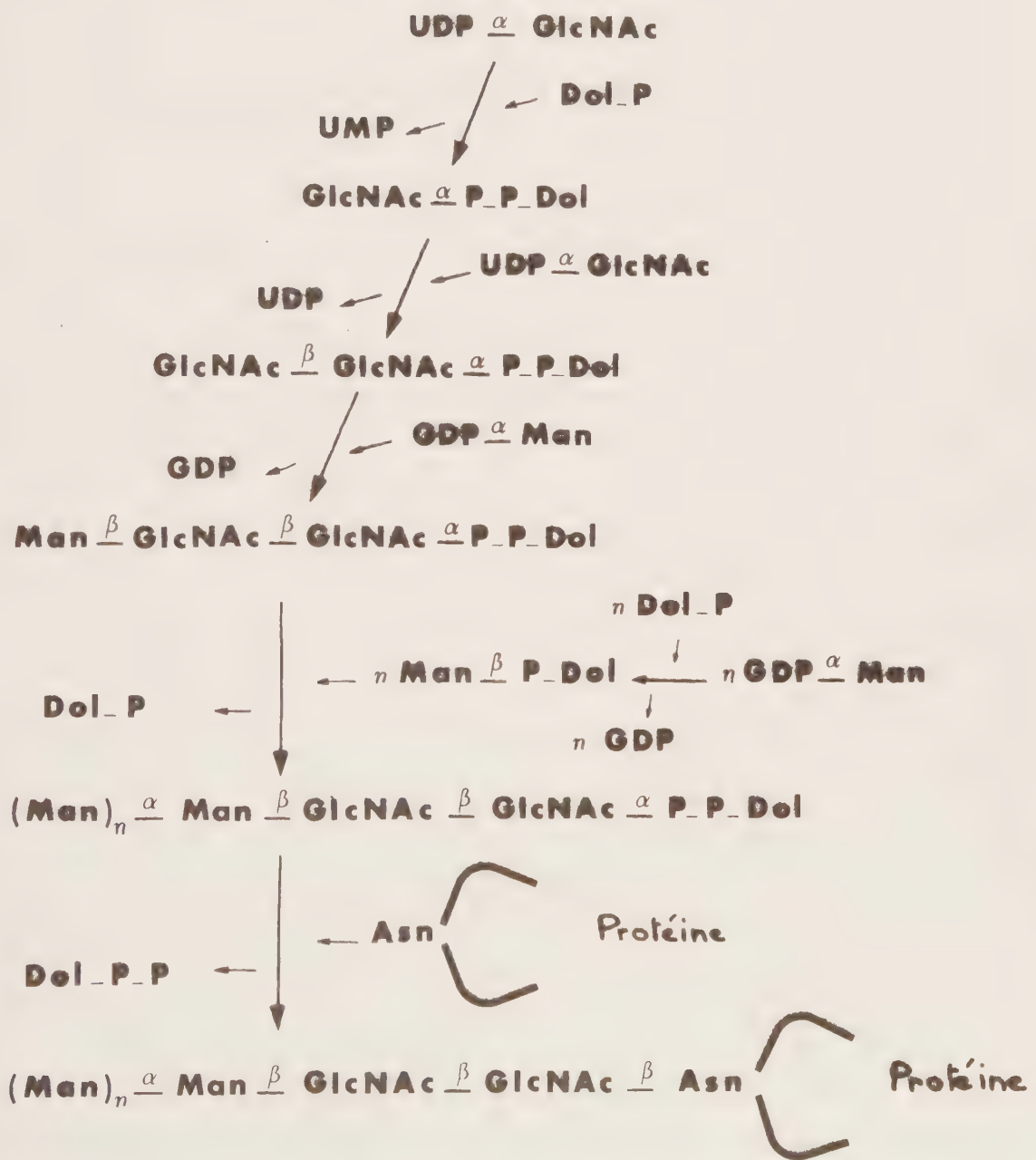
Dans un premier temps, il y a formation d'un oligosaccharide porté par un intermédiaire lipidique isoprénoïque le dolichol, sous forme active pyrophosphate (14, 327) ; puis, cette chaîne oligosaccharidique est transférée en bloc du lipide à la protéine comme le montre la figure 1. Les réactions sont réversibles et catalysées par des glycosyl transferases liées aux membranes. La glycosylation initiale des chaînes polypeptidiques semble se réaliser dans

FIGURE 1

BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES

ROLE DU DOLICHOL

selon WAECHTER et LENNARZ 1976



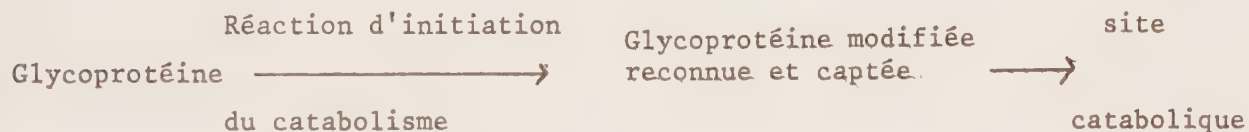
l'ergastoplasme ou reticulum endoplasmique rugueux (53-279) et d'autres transporteurs lipidiques que le dolichol (le retinol et un dérivé de la vitamine K (261-327)) peuvent intervenir.

Les protéines qui, au cours de l'étape précédente, seraient passées en se glycosylant à travers la membrane de l'ergastoplasme pour rejoindre l'espace cisternal (53), iraient ensuite dans l'appareil de Golgi où se ferait étape par étape l'addition des sucres apportés sous forme active de diphosphonucléotides. Ces additions se réalisent grâce à des transferases extrêmement spécifiques (333).

La localisation des étapes de cette synthèse a été clairement illustrée par HEMMING (105) (figure2).

I.1.5. - Catabolisme des glycoprotéines

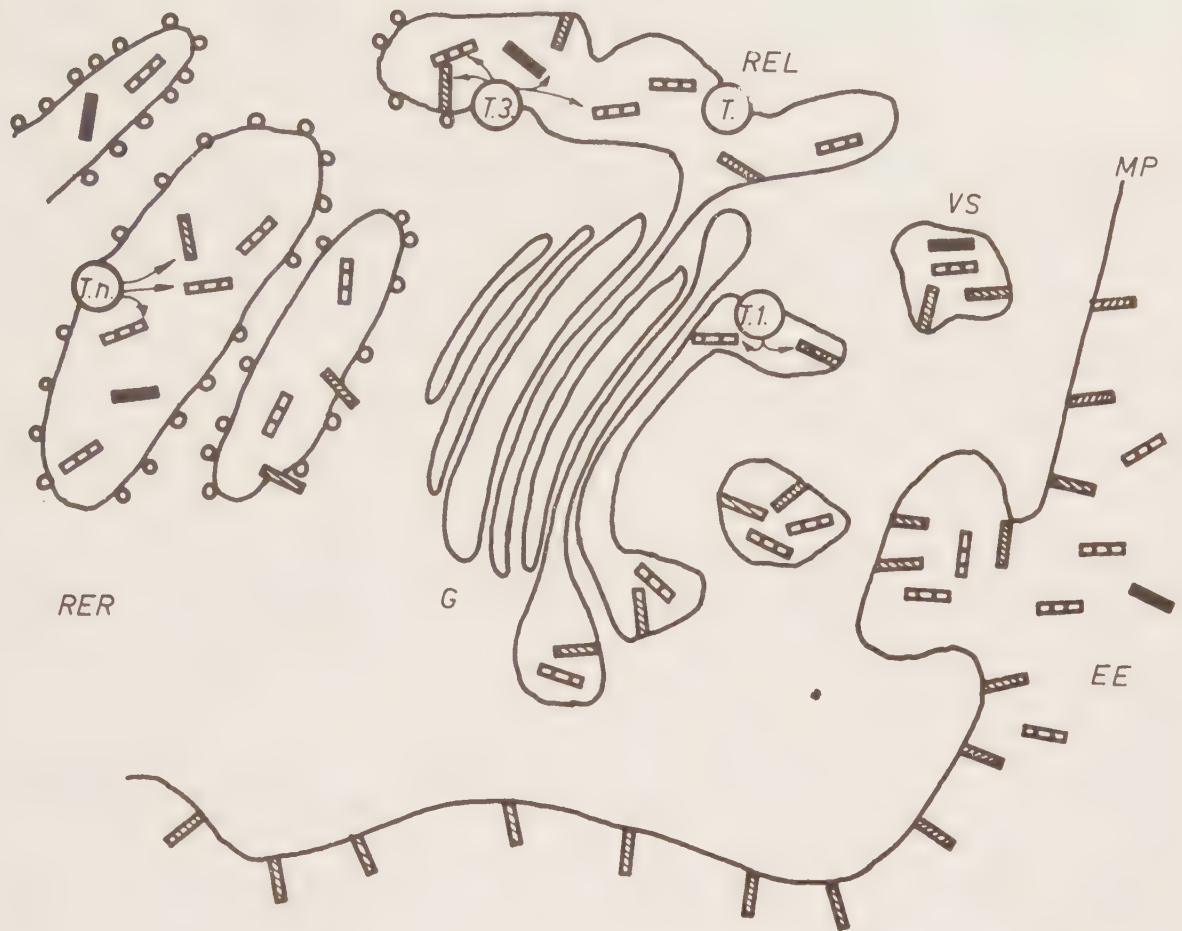
Les glycoprotéines "usagées" vont pénétrer dans la cellule grâce aux processus d'endocytose puis seront digérées à leur site catabolique : le lysosome secondaire, selon la séquence proposée par GREGORIADIS (100).



La captation des glycoprotéines "usagées" du plasma est réalisée principalement par le foie ; des signaux constitués par la nature du monosaccharide situé en position terminale non réductrice sur la chaîne isoglycanique permettent la reconnaissance et l'endocytose des glycoprotéines "usagées". Les connaissances actuelles de ce mécanisme sont le résultat d'expériences animales étudiant la captation de glycoprotéines marquées diversement modifiées.

MOREL (206) a montré que les asialoglycoprotéines plasmatiques révélant un galactose terminal sont rapidement captées par les récepteurs membranaires de la cellule parenchymateuse hépatique puis catabolisées ; il a

FIGURE 2



RER réticulum endoplasmique
rugueux

MP membrane plasmatique

G appareil de Golgi

EE espace extracellulaire

REL reticulum endoplasmique
lisse

T1...Tn glycosyltransférases liées à
la membrane

VS vésicule sécrétoire

— glycoprotéines destinées à
la sécrétion
— glycoprotéines destinées à la
membrane cytoplasmique

— REPRESENTATION DE LA SYNTHÈSE DES GLYCOPROTEINES —
d'après HEMMING. 1977.

également mis en évidence le caractère compétitif de la captation de 2 ou plusieurs asialoglycoprotéines à galactose terminal (le processus est toutefois complexe puisque les analogues carbohydratés simples n'exercent pas d'inhibition compétitive).

Le récepteur hépatique spécifique a même pu être isolé : il s'agit d'une glycoprotéine contenant de l'acide sialique retrouvée dans les membranes d'organites subcellulaires du foie de rat (253).

Un second récepteur hépatique spécifique des glycoprotéines à résidu N-acétyl glucosamine terminal a été ultérieurement découvert chez le rat (291) et les oiseaux (180)

STOCKERT (291) a également suggéré l'existence d'un récepteur membranaire des cellules rénales reconnaissant les glycoprotéines terminées par un résidu mannose.

Le catabolisme :

Les glycoprotéines reconnues et endocytées sont amenées à leur site catabolique, le lysosome où leur dégradation s'effectue sous l'action de trois catégories d'hydrolases (4 - 100).

- les enzymes protéolytiques qui coupent les liaisons entre les acides aminés (cathepsines A,B, C, D IV, carboxypeptidase acide, dipeptidylaminopeptidase II,...)

- les hydrolases qui coupent la liaison glycanne-peptide c'est à dire dans le cas des glycoprotéines à liaison N-acétyl-glucosaminylasparagine : l'asparaginyl N-acétylglucosamine amidohydrolase.

- les glycosidases qui coupent les liaisons entre les unités osidiques. A l'exception d'une endo beta-N-acétyl glucosaminidase, ce sont des exoglycosidases réalisant une dégradation récurrente étape par étape. L'activité Beta endo N-acétylglucosaminidase a été suspectée après l'isolement d'oligosaccharides

présentant un résidu N-acétyl glucosamine en position terminale réductrice (294) et a été mise en évidence dans le foie humain (22).

Les glycoprotéinoses actuellement connues sont toutes dûes au déficit d'une exoglycosidase. Deux schémas du catabolisme des glycoprotéines du type lactosaminique ont été proposés l'un par TSAY (309), l'autre par STRECKER (294) : ils sont très similaires et expliquent de façon satisfaisante les structures des produits de surcharge que l'on a pu identifier dans les diverses glycoprotéinoses (figure 3).

Toutefois, ces schémas font apparaître :

- que les déficits en Beta endo-N-acétylglucosaminidase et en Beta-mannosidase n'ont pas été retrouvés jusqu'ici.

- que l'unicité ou la multiplicité enzymatique des activités sialidases (α - 2,3) et (α - 2,6) et des activités mannosidases (α - 1,3) et (α - 1,6) doit être étudiée.

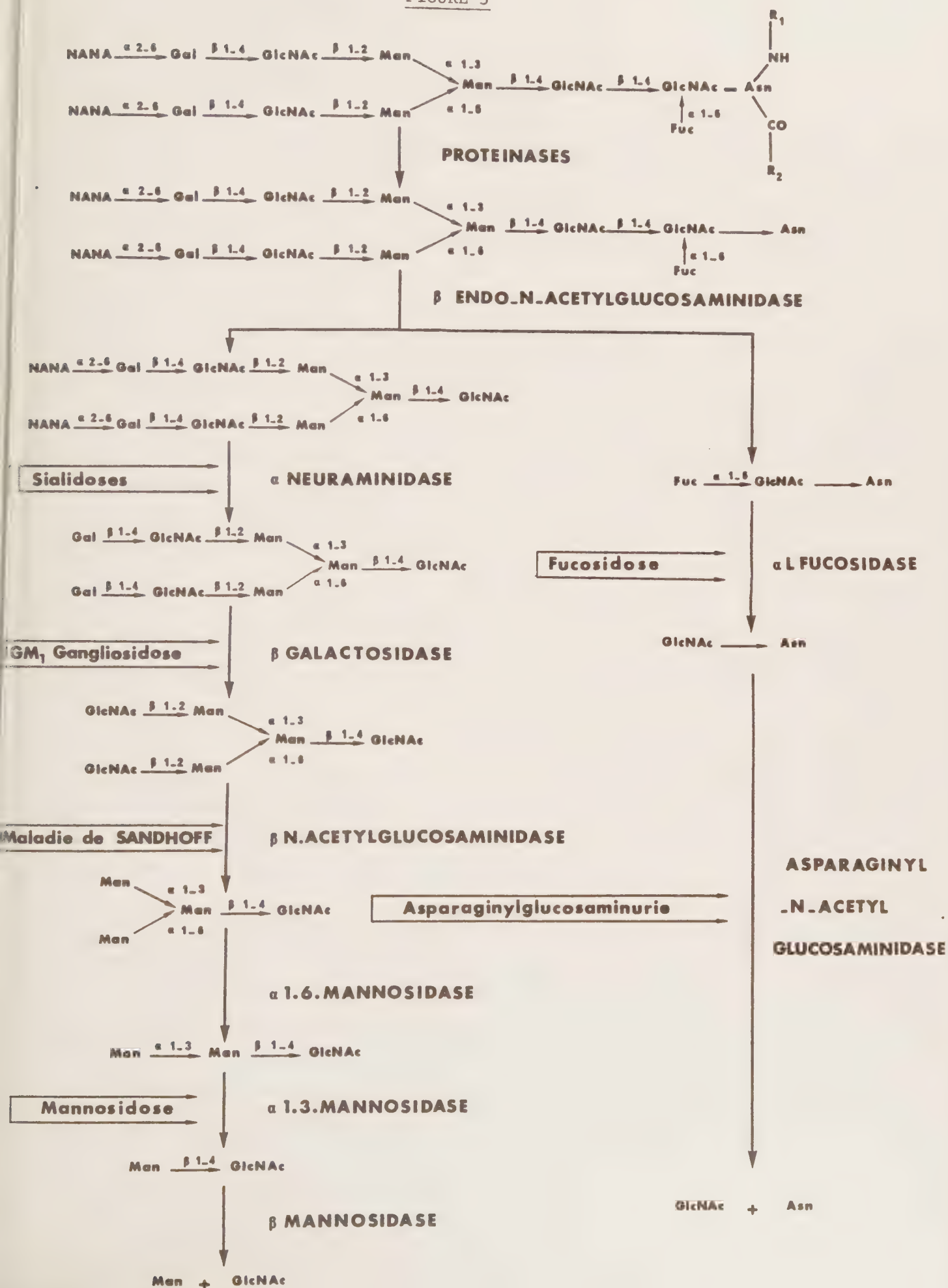
- et qu'il reste à étudier le mécanisme d'entrée des glycoprotéines dans le plasma et de début de leur dégradation (205) : en effet, si l'on a bien caractérisé une Beta endo N acétyl glucosaminidase, cette enzyme semble être cytosomale alors que les exoglycosidases sont lysosomiales.

D'autre part, le matériel accumulé dans toutes les glycoprotéinoses provient des glycoprotéines à noyau mannotriosidochitobiose et l'on n'explique pas l'absence de matériel issu de glycoprotéines à liaison O.glycosidique ("mucine-like").

CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES DE TYPE LACTOSAMINIQUE

selon G. STRECKER - 1977 -

FIGURE 3



I.2. - LA MANNOSIDASE

I.2.1. - Caractères généraux des enzymes lysosomiales

a) Synthèse - Transport

La plupart, sinon toutes les enzymes lysosomiales, sont des glycoprotéines renfermant de la N-acétylglucosamine, du mannose, du glucose et de l'acide N-acétyl neuraminique (92).

Après avoir été synthétisée au niveau des ribosomes, la partie protéique est transférée dans l'espace cisternal des membranes du reticulum endoplasmique le long desquelles s'effectue la glycosylation qui va s'achever dans l'appareil de Golgi ou dans le GERL (221-22) (partie spéciale du reticulum endoplasmique lisse en contact étroit avec la face concave de l'appareil de Golgi). Ce mécanisme a été démontré expérimentalement pour la Beta glucuronidase, la phosphatase acide, la Beta galactosidase, la Beta N acétylhexosaminidase et l'arylsulfatase A (93-94-310-311).

Les enzymes glycolytiques sont alors concentrées dans de petites vésicules entourées par une membrane ; ce "packaging" s'effectue selon les théories par bourgeonnement de l'appareil de Golgi ou au niveau du GERL (222).

Au cours des migrations intracellulaires effectuées lors de cette synthèse, la mobilité anodique et la solubilité des cinq hydrolases acides précédemment citées augmentent par suite de la fixation de groupements N-acétyl neuraminiques (les points isoélectriques des enzymes liées au reticulum endoplasmique rugueux sont supérieurs à 6). (93-94).

Les vésicules d'enzymes ou lysosomes primaires vont ensuite fusionner avec des vacuoles de pinocytose, phagocytose ou autophagie pour donner naissance à des lysosomes secondaires où s'effectuera la digestion lysosomiale. A l'appui de cette théorie, il a été possible d'observer la fusion de granules azurophiles isolés (lysosomes primaires) des polynucléaires avec des vacuoles de phagocytose après ingestion de bactéries (47). Un tel mécanisme par contre, est beaucoup moins bien établi pour les cellules non phagocytaires.

Une autre hypothèse a été proposée par HICKMAN et ses collaborateurs (109-110) après étude des fibroblastes en culture de sujets atteints de mucopolipidose de type II :

Les fibroblastes et l'hypothèse de secretion - recaptation de HICKMAN et NEUFELD (215-313-326)

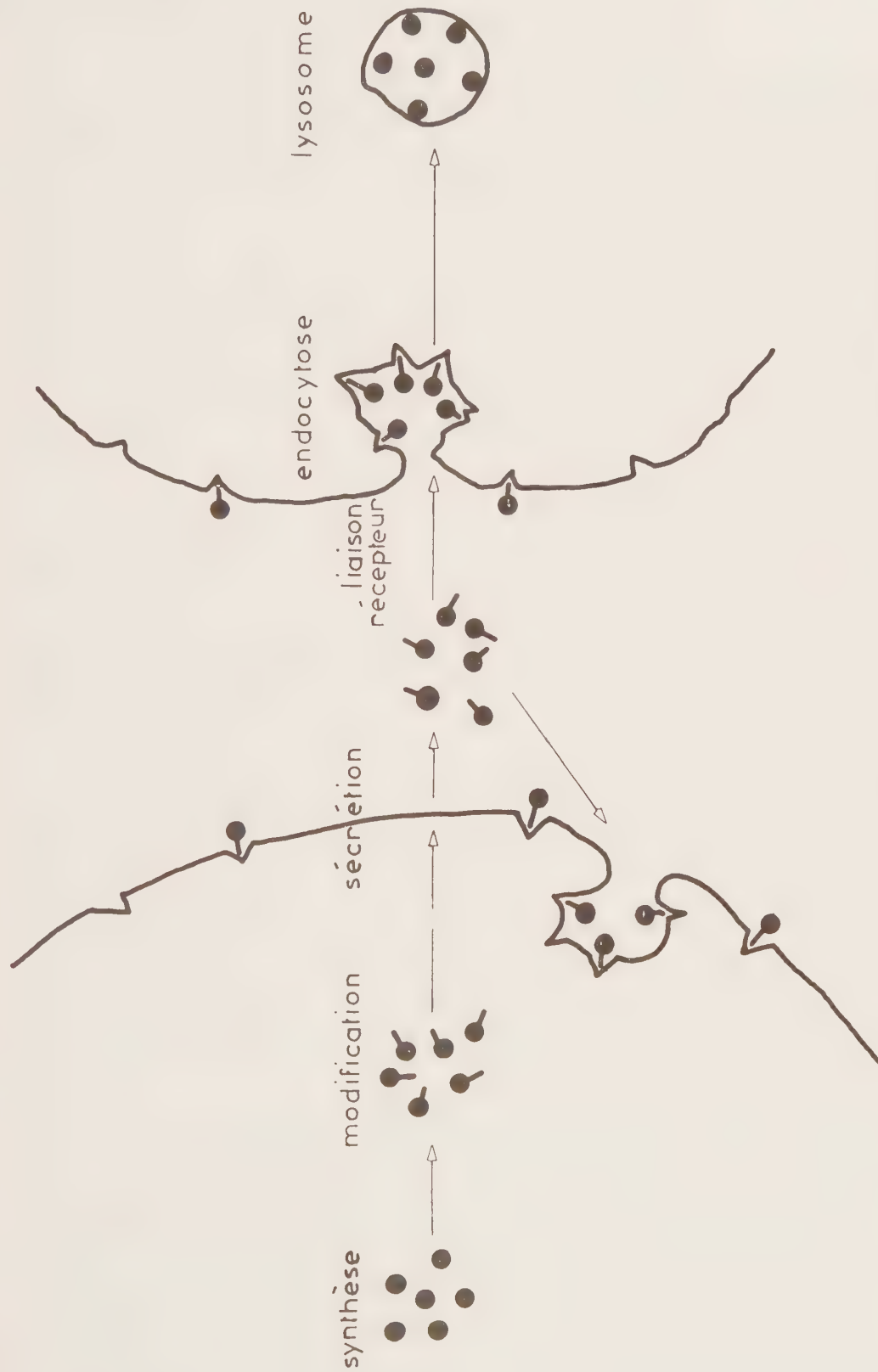
Cette hypothèse suppose que les hydrolases acides sont sécrétées à l'extérieur de la cellule et recaptées par endocytose grâce à des sites de reconnaissance membranaires de la cellule et finalement enrobées ("packagées") dans les lysosomes.

Avant d'être sécrétées, les enzymes seraient donc munies d'un système structural de reconnaissance pour assurer leur liaison avec les récepteurs de la surface cellulaire. Les vacuoles de pinocytose de ces enzymes, seraient alors, si aucun substrat n'est capté en même temps, des lysosomes primaires et, dans le cas contraire, des lysosomes secondaires (figure 4).

La sécrétion des enzymes lysosomiales (326) dans le milieu de culture des fibroblastes est faible (sauf pour la Beta-N-acétylhexosaminidase) et stimulée par l'apport de milieu frais. Elle semble contrôlée par l'intégrité des microfilaments et microtubules qui forment une sorte de "squelette" cytoplasmique : et c'est en altérant ces structures que la cytochalasine B (325), la colchicine, la vinblastine et la vincristine augmenteraient cette sécrétion ; le rôle des nucléotides cycliques dans ce phénomène de sécrétion a été également étudié (64). D'autres auteurs (211) attribuent ce phénomène dans les polynucléaires à une variation de perméabilité de la membrane aux ions calcium induite par le facteur chimiotactique : la sécrétion des enzymes lysosomiales se matérialisant dans ces expériences par une dégranulation des polynucléaires.

Cette sécrétion a pu être également mise en évidence dans d'autres types cellulaires, souvent sous l'action de divers stimuli physiologiques ou pharmacologiques (56). C'est le cas des ostéoclastes sous l'action de l'hormone parathyroïdienne au cours de la résorption osseuse (314), des polynucléaires (114) et des macrophages (56) (la sécrétion y est influencée par la vitamine K, les complexes antigène - anticorps, l'AMP et le GMP cycliques...)

FIGURE 4



selon NEUFELD 1972

HYPOTHESE DE SECRETION-RECAPTATION.
CYCLE D'UNE ENZYME LYSOSOMIALE

La recaptation des enzymes lysosomiales à partir du milieu de culture des fibroblastes

- a reçu une preuve expérimentale grâce à la création de déficits lysosomiaux intracellulaires par la chloroquinine qui inhibe ce phénomène en bloquant les récepteurs membranaires (331),

- a pu être étudiée en ajoutant au milieu de culture de cellules, qui en sont génétiquement dépourvues, l'hydrolase acide manquante : il est alors aisé de suivre parallèlement la diminution d'activité extracellulaire et l'augmentation intracellulaire ; la correction peut être objectivée par la diminution du matériel stocké.

Selon VON FIGURA (326), deux types de pinocytose peuvent être impliqués dans ce phénomène :

- la pinocytose passive peu efficace, non spécifique, fonction des concentrations relatives de l'enzyme dans les milieux intra- et extra cellulaires, et dont l'existence même est sujette à discussion (264).

- et la pinocytose adsorptive ou active, sélective, efficace, saturable, qui met en jeu des récepteurs membranaires et des sites de reconnaissance sur la molécule enzymatique. Cette pinocytose active suit une cinétique du type de MICHAELIS-MENTEN (135) et la forme de la courbe d'adsorption dépend de l'affinité de la macromolécule enzymatique pour son récepteur membranaire (on peut donc définir une K_m apparente) et du nombre de récepteurs cellulaires accessibles (ce qui permet de définir une vitesse maximale) (215).

La vitesse de captation varie beaucoup d'une hydrolase à l'autre, mais aussi, pour une même hydrolase, d'un tissu à l'autre (28), et, pour une même hydrolase d'une même source, d'une préparation à l'autre (326). Des différences de point isoélectrique (alpha N acétylglucosaminidase urinaire et Beta glucuronidase) ou de poids moléculaire (alpha L iduronidase) ont pu être mises en évidence entre les formes à captation faible et forte mais elles présentent toutes la même activité vis à vis des substrats synthétiques ; les différences structurales doivent donc se situer uniquement au niveau du site

de reconnaissance de l'enzyme pour le récepteur cellulaire.

La transformation de la Beta N acétyl hexosaminidase à captation forte en enzyme à captation faible d'activité catalytique identique, par oxydation périodique ménagée (110), a conduit les auteurs à rechercher des sites de reconnaissance glucidiques. La structure de ces sites peut être appréhendée :

- soit en modifiant chimiquement ou enzymatiquement le site ou en le masquant par des lectines,

- soit en utilisant des inhibiteurs qui entrent en compétition avec le signal de reconnaissance de l'enzyme au niveau des récepteurs cellulaires (313),

- soit en ajoutant au milieu de culture des anticorps anti-enzymes dont les sites immunologiques entrent en compétition avec les récepteurs cellulaires (215).

La pinocytose d'assez nombreuses hydrolases acides peut être inhibée par la chloroquinine (111-331), le mannose, le fucose, le méthyl alpha mannoside, le fructose-1-phosphate et surtout le mannose-6-phosphate (147-148-149-215-264-313). La disparition des phénomènes d'endocytose active après action de la phosphatase alcaline sur l'enzyme, associée aux résultats des expériences d'inhibition compétitive, a conduit les auteurs à proposer pour le site de reconnaissance de ces hydrolases à captation forte un résidu glucidique phosphorylé probablement le mannose-6-phosphate.

Il est probable (264) que le mannose-6-phosphate n'est pas la seule structure de l'enzyme reconnue par le récepteur cellulaire puisque le mannose 6-phosphate compris dans certaines macromolécules est plus inhibiteur que le mannose-6-phosphate libre (149). Ces sites de reconnaissance peuvent être les mêmes d'une espèce à l'autre : les fibroblastes humains reconnaissent par exemple la Beta galactosidase bovine (111) grâce à un résidu mannose alors que curieusement ils ne semblent pas reconnaître la Beta-galactosidase (et l'alpha-glucosidase) des fibroblastes humains puisque la coculture des fibroblastes

normaux avec ceux d'une gangliosidose à GM1 ne permet pas leur correction (255).

Les fibroblastes semblent posséder d'autres types de récepteurs puisqu'ils reconnaissent d'autres signaux que les glucides phosphorylés : ainsi la Beta glucuronidase de foie de rat est captée par les fibroblastes ; son site de reconnaissance est certes inconnu mais on sait qu'il n'est pas sensible à l'action de la phosphatase alcaline (313).

Enfin, si d'autres marqueurs (résidu Beta galactose, Beta N acétyl glucosamine et alpha mannose) permettent la clairance des glycoprotéines en général et des enzymes lysosomiales en particulier par le foie, la rate ou le rein, les sucres phosphorylés ne sont pas néanmoins reconnus exclusivement par les fibroblastes : il semble ainsi qu'un sucre phosphorylé soit reconnu par les hépatocytes de rat (313).

Recentement, il a pu être démontré que l'endocytose des formes à captation faible des enzymes lysosomiales est également inhibée par les sucres phosphorylés ou le pretraitement par la phosphatase alcaline (264-313). Ceci implique, dans la mesure où l'on peut exclure toute contamination par une forme à captation forte, que, même pour les formes à captation faible, l'endocytose est également adsorptive et se fait par liaison avec un récepteur mais avec une affinité bien moindre (K_m apparente beaucoup plus importante).

La captation des hydrolases acides a été également largement étudiée dans un autre modèle : le foie de rat. La clairance de l'enzyme injectée dépend là encore, de la source de l'enzyme (287). La clairance de la forme lentement captée est uniquement fonction de la dose injectée. La clairance de la forme à captation forte de la Beta glucuronidase est un phénomène saturable qui implique donc des récepteurs et les expériences d'inhibition compétitive ainsi que les modifications chimiques du site de reconnaissance ont permis de suspecter le rôle important de la N-acétyl-glucosamine dans la structure de ce site ; enfin, les expériences de clairance compétitive des diverses hydrolases acides permettent de supposer que ce site est commun à un grand nombre d'entre elles. SCHLESINGER (265) a montré que l'enzyme captée se retrouve effectivement dans le lysosome.

Intérêt de la théorie de secretion - recaptation. Elaborée pour expliquer les phénomènes observés dans la mucopolipidose de type II, la théorie de HICKMAN-NEUFELD, même si elle est incomplète ou discutée sur certains points (171-324), a conduit de nombreux auteurs à s'intéresser à l'existence de formes enzymatiques de même activité catalytique mais plus ou moins captées en fonction à la fois de la structure de leur site de reconnaissance et de la structure des récepteurs de la cellule captante. La connaissance et la maîtrise de ces problèmes constituent les premiers pas pour la mise en place d'essais cohérents de thérapie enzymatique substitutive dans les maladies de surcharge lysosomiale.

b) les propriétés générales des enzymes lysosomiales (57-94-280)

Les enzymes lysosomiales sont des hydrolases, agissant à un pH optimal acide. Ce sont des glycoprotéines présentant de nombreuses formes moléculaires dont la nature et le taux varient avec l'origine de l'enzyme et l'état physiologique de l'organisme. Enfin, ces enzymes sont remarquablement stables à la destruction par les protéases peut être grâce à leur liaison à la membrane des lysosomes (116) et peut être aussi grâce à leurs chaînes isoglycaniques.

Les bases biochimiques et les fonctions possibles de ces formes moléculaires sont le plus souvent mal élucidées. On peut les différencier par leurs propriétés physicochimiques (leur charge : point isoélectrique, électrophorèse, résines échangeuses d'ions, ou leur masse moléculaire ou leur structure sous-unitaire ou enfin leur composition en acides aminés ou en glucides), par leurs propriétés enzymatiques (pH optimal, Km, stabilité thermique, action des effecteurs) ou immunochimiques (156-280).

Le problème des interrelations entre les diverses formes moléculaires (257-258) est complexe : si des relations existent entre les formes acides A et B, la forme C neutre non lysosomiale serait codée par un autre gène. Les relations entre les formes microsomiales, lysosomiales et cytosoliques nécessitent pour leur étude des fractions subcellulaires suffisamment pures, en quantité

suffisante.

D'autre part, les hydrolases lysosomiales acquièrent dans l'appareil de Golgi avec l'attachement de résidus N-acétyl neuraminiques une charge négative et une plus grande solubilité (l'action de la neuraminidase aura l'effet inverse) et la présence de l'acide N-acétyl neuraminique joue certainement un rôle dans l'hétérogénéité des glycosidases.

Enfin, la détermination d'activité "in vitro" semble ne pas être un bon reflet de ce qui a lieu "in vivo": en effet, "in vitro", ces enzymes sont plus actives sur des substrats de faible poids moléculaire ; hors, "in vivo", les glycosidases doivent attaquer d'abord les oligosaccharides de poids moléculaire élevé : il est donc probable qu'il existe "in vivo", des activateurs du type de ceux que l'on commence à étudier pour les hydrolases des sphingolipides (168-207).

I.2.2. - L'alpha Mannosidase (E.C.3.2.1.24)

L'alpha mannosidase a été isolée à partir de différentes sources végétales ou animales, principalement pour déterminer les configurations anomériques des résidus mannose des chaînes glucidiques des glycoprotéines. Dans ce but, les auteurs ont essayé d'obtenir des enzymes assez pures et assez stables qui hydrolysent les substrats de haut poids moléculaire.

Les alpha mannosidases végétales

Chez les végétaux, l'alpha mannosidase a été purifiée à partir du pamplemousse (167) de *Phaseolus Vulgaris* (1-238-239), du soja (263), des coléoptiles d'*Avena Sativa* (101), de *Medicago Sativa* (65-66), de la farine de la fève Jack ou *Canevalia Ensiformis* (44-166-251-271-276).

- l'alpha mannosidase de *Canevalia Ensiformis* est une metalloenzyme à zinc (1,66 à 2 atomes de zinc par molécule) de poids moléculaire de l'ordre de 230.000, active à pH acide, mais stable à pH 8. Une méthode simple de purification par chromatographie d'affinité vient d'être rapportée (251).

- l'alpha mannosidase des coléoptiles d'Avena Sativa a un poids moléculaire de l'ordre de 630.000, un pH optimal d'action de 4,5 ; elle comprend une partie glucidique, elle est très associée à la membrane cellulaire, ne possède pas de cofacteur métallique et présente une bonne stabilité thermique.

- l'alpha mannosidase de Phaseolus Vulgaris existe sous deux formes présentant une grande identité immunologique : l'alpha mannosidase I de poids moléculaire de l'ordre de 200.000 et de point isoélectrique 5,1, et l'alpha mannosidase II de point isoélectrique 6,1. PAUS (239) propose pour les purifier une technique élégante et d'excellent rendement, utilisant des anticorps anti-enzymes semi-purifiés fixés sur du sépharose 4B activé au bromure de cyanogène.

Les alpha Mannosidases bactériennes et fungiques

Parmi les alpha mannosidases bactériennes et fungiques, les alpha mannosidases extracellulaires ont été les plus étudiées. JONES et BALLOU (144) ont suggéré que les alpha mannosidases bactériennes extracellulaires sont synthétisées pour digérer les levures (elles sont inductibles par les mannanes ou des levures entières ajoutées au milieu de culture) et que les autres alpha mannosidases sont plutôt impliquées dans le métabolisme des glycoprotéines. Ainsi, il a isolé du milieu de culture d'un microorganisme du sol (*Acinetobacter* Sp. (150)) pouvant pousser dans un milieu ayant la levure de boulangerie comme source de carbone, une alpha mannosidase coupant uniquement les liaisons alpha 1,2-mannosyles à l'extrémité non réductrice ; de même, il a été isolé du milieu de culture d'*ARTHROBACTER* Sp. (144-145) une mannosidase qui coupe les liaisons alpha 1,2 et alpha 1,3 mannosyles de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et laisse intactes les liaisons alpha 1,6.

- Deux alpha mannosidases ont été isolées d'Aspergillus Niger :

. l'une coupe les résidus mannose fixés en alpha 1,2 à l'extrémité terminale non réductrice (301) ; elle n'est pas ou peu inhibée par la D-mannono 1,5 lactone, présente un pH optimal de 4,8, et est peu active sur les substrats de haut poids moléculaire ;

. l'autre scinde les liaisons alpha 1,4 et alpha 1,6 entre les résidus mannoses terminaux et le mannose ou la N-acétyl glucosamine ; elle est

très inhibée par la D mannono-1,5-lactone, a un pH optimal de 4,2 et hydrolyse très lentement le para nitrophényl alpha D mannopyranoside (194). Ces deux alpha mannosidases ne semblent pas dépendantes des ions zinc.

- Une autre alpha mannosidase a été isolée de la levure de boulangerie (152-153), mais son instabilité, sa purification délicate et sa faible activité vis à vis des longues chaînes de sucre la rendent peu favorable à l'étude de la structure des glycoprotéines ; en outre, elle présente un pH optimal de 6,8 et semble correspondre plutôt à une alpha mannosidase neutre.

- De Saccharomyces Cerevisiae OPHEIM (235) a isolé une alpha D mannosidase unique liée solidement à une fraction particulière qui ne nécessite pas de cations pour être active et qui doit jouer un rôle dans la sporulation.

- De Dictyostelium Discoïdeum KILPATRICK (155) a isolé deux alpha mannosidases, l'une liée aux membranes, l'autre soluble activée par les ions zinc, de pH optimal acide et séparable en deux formes.

Une exomannosidase a été mise en évidence dans la culture de Penicillium Charlesii (252) et enfin, une alpha mannosidase très particulière liée à la surface cellulaire de Streptomyces Griseus transforme la mannosido-streptomycine en streptomycine (62-132-133) : son pH optimal d'action est de l'ordre de 7 à 9 et elle nécessite un cation divalent (Mn^{++}) pour être active.

Les alpha Mannosidases animales

- Les mollusques Chariona Lampas, Turbo Cornutus (208) et Patella Vulgata (173) se sont révélés des sources intéressantes d'alpha D mannosidase dont la vitesse d'hydrolyse est augmentée par les chlorures. L'enzyme de Patella Vulgata semble être une metalloenzyme ou un complexe enzyme-ion métallique zinc dissociable à son pH optimal d'action (3,5 - 4) où il nécessite la présence de ces ions zinc.

- Les oiseaux. A part l'étude d'une alpha mannosidase du jaune d'oeuf (59) et d'oviducte de poule (298) les autres auteurs se sont intéressés aux mammifères.

- Les mammifères :

1° le rat. Les recherches les plus importantes du point de vue de la localisation subcellulaire de l'enzyme ont été entreprises sur le foie de rat ; elles ont permis de mettre en évidence trois alpha mannosidases :

- . une lysosomiale (48-234)
- . une localisée dans les membranes de l'appareil de Golgi (72-312)
- . une cytosolique (189-270-275),

différant par leur poids moléculaire et celui de leurs sous-unités, leur pH optimal et leurs nécessités en ions métalliques (234) ; mais à part l'alpha mannosidase lysosomiale, leur rôle est mal connu ; les trois enzymes ont "in vitro" une activité très limitée sur les glycoprotéines mais hydrolysent les liaisons mannosyles alpha 1,2 et alpha 1,3 des glycopeptides et des oligosaccharides sauf l'enzyme des membranes de Golgi qui ne coupe que les alpha 1,2 ; les trois enzymes ne présentent pas de composantes immunologiques communes et doivent donc provenir d'origines génétiques différentes. Une composante immunologique commune existe par contre entre l'enzyme lysosomiale hépatique et l'alpha D mannosidase d'épididyme de rat (272-275)

Diverses activités alpha mannosidases ont été également mises en évidence dans le testicule de rat (274-275-277). Dans le testicule et le foie de rat, SNAITH (278) distingue par l'action des cations divalents, outre une alpha mannosidase acide, trois alpha mannosidases neutres.

Du cortex cérébral de rat, BOSMANN (25) a isolé une alpha mannosidase de pH optimal 4,1 qui est une hydrolase spécifique pour le sucre terminal (mannose) et la liaison alpha, mais pas pour l'aglycone.

2° les autres mammifères - le porc. L'alpha mannosidase a été encore étudiée chez le lapin (299), le boeuf (162-195) et le porc

L'alpha mannosidase acide a été mise en évidence dans le foie, le pancréas et le rein de porc (232) ; elle a été purifiée à partir du tissu le plus riche : le rein (232-233-298)

L'alpha mannosidase acide de rein de porc est une glycoprotéine, sans amino-acides soufrés, qui serait de structure tétramérique.

- . le point isoélectrique est de 5,8 - 5,9,
- . le pH optimal de 4,2 ,
- . la constante de Michaelis pour le p.nitrophenyl alpha D mannopyranoside est de 0,91 mM pour OKUMARA (233) et de 1,4 mM pour MERSMAN (197-198) ; ce substrat est inhibiteur aux concentrations élevées,
- . l'enzyme présente une spécificité large pour l'aglycone tant en ce qui concerne sa nature qu'en ce qui concerne la position dans laquelle il est substitué par le résidu mannose (alpha 1,2, alpha 1,3, alpha 1,6) ; mais le type et la taille de l'aglycone influencent beaucoup la vitesse d'hydrolyse (233),
- . du point de vue immunologique les anticorps anti-alpha mannosidase acide de rein de porc réagissent avec l'alpha mannosidase acide de rein, foie et rate de porc et aussi à un degré moindre, de foie de boeuf et d'urine, placenta et fibroblastes cutanés humains. Par contre ces anticorps ne réagissent pas avec l'alpha mannosidase neutre de foie de boeuf, de placenta ou sérum humain ou de sérum de lapin, (199).

Les alpha Mannosidases Humaines

1° Localisation tissulaire. L'activité alpha mannosidase a été mise en évidence dans :

- . les tissus :
 - foie (38-42-117-123-124-131-243 à 246- 250-258-259)
 - rate (42)
 - pancréas (42)
 - rein (42-121-185)
 - cerveau (29-42)
 - nodules lymphatiques (42)
 - placenta et tissus foetaux (42-330)
 - racines de cheveux (248)
 - thyroïde (39)

- . les cellules :
 - leucocytes (8-71-108-120-191-192)
 - plaquettes (26)
 - fibroblastes cutanés en culture (79-119-250-302)
 - cellules amniotiques non cultivées (63) et en culture (9-34-35-126-330)
 - cellules lymphoblastoïdes (193-300)
- . les liquides biologiques :
 - serum et plasma (41-50-51-84-112-125-191-226)
 - urine (41-121-319)
 - liquide cephalo rachidien (29-41-321)
 - liquide synovial (11)
 - larmes (319-320)
 - liquide amniotique (33-43-122-330)

L'alpha mannosidase est donc très largement distribuée dans tous les tissus et liquides de l'organisme mais l'activité globale et surtout la répartition des "formes enzymatiques multiples" (dénomination recommandée en 1976 par la "Commission on Biochemical Nomenclature IUPAC-IUB") varient beaucoup d'un tissu à l'autre.

2° Mise en évidence et séparation des formes enzymatiques dans les divers tissus et liquides biologiques.

- . Mise en évidence. Elle repose sur les propriétés suivantes :

Thermostabilité : seules les formes acides ont une grande stabilité thermique (42-243)

Influence du pH (42) elle permet de distinguer :

- une forme acide de pH optimal 4 - 4,5
- une forme intermédiaire de pH voisin de 5,5
- une forme neutre de pH optimal voisin de 6,5

(tableau 1).

TABLEAU 1

IVERSES FORMES DE L'ALPHA D MANNOSIDASE
(D'après l'influence du pH de mesure d'activité)

FORMES Tissu ou liquide biologique	Acides pH opt. 4 - 4,5	Intermédiaire pH opt. 5,5	Neutre pH opt. 6,5	Références Bibliographiques
Rein	+		+	42-185-250
Pancreas	+		?	42
Nodules Lymphatiques	+		?	42
Foie	+	+ (liée à la forme neutre)	+	42-243
Rate	+		+	42
Placenta	+		+	42
Cerveau	+		+	29-42-
Racines de cheveux	+		0	248
Leucocytes	+		+	8-108-191
Fibroblastes cutanés et cellules amniotiques en culture	+		0 (250) +	126-127-250- 302
cellules lymphoblas- toïdes	+		+	300
Sérum	+	+		41-51-125-226
Urine	+	+		41
LCR	+	+		41

:	:	:	:	:
: liquide amniotique	: +	: +	:	: 32-122-330
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
: Larmes	: +	: +	:	: 320
:	:	:	:	:

+ = présence d'activité

? = pas de certitude - activité absente ou labile

0 = absence d'activité

Autres propriétés enzymatiques telles que influence de la concentration en substrat et action des effecteurs aux divers pH.

. Séparation :

§ la chromatographie sur résines échangeuses d'ions

La chromatographie sur DEAE-cellulose d'homogenats de foie (38) permet de séparer :

une forme A qui n'est pas retenue par la colonne

une forme B qui nécessite pour être éluée un gradient de chlorure de sodium (cette forme peut même être résolue en formes B1 et B2 si la concentration saline du gradient croît très lentement (42)).

une forme C éluée à une concentration saline supérieure.
les formes A et B ont un pH optimal acide tandis que la forme C présente un pH optimal de l'ordre de 6,5.

La chromatographie sur CM-cellulose inverse l'ordre de sortie des différentes formes acides : B n'est pas retenu et A nécessite pour son élution un gradient salé.

§ L'électrophorèse :

Sur acétate de cellulose

TAYLOR (302) révèle deux bandes acides A et B à pH acide

une bande C à pH neutre (assez mal séparée de la bande acide la plus anodique).

POENARU et DREYFUS (250) complètent cette étude par une

révélation à un pH intermédiaire qui permet de visualiser les trois bandes.

Sur gel d'amidon, BURTON et NADLER (30) réalisent la séparation des bandes acides A et B.

§ La focalisation électrique (38-119-243-246) ne permet pas une séparation aussi nette que pour les autres hydrolases acides.

§ Le passage sur concanavalline-A-sepharose (246) permet la séparation entre les formes acides qui se lient à la résine et la forme C qui n'est pas retenue.

3° Propriétés des différentes formes de l'alpha mannosidase humaine

a) les formes acides A et B

a.1. Elles semblent reliées structuralement et génétiquement

- ce sont des glycoprotéines (elles se lient à la concanavalline A sepharose et sont sensibles à l'action de la neuraminidase).

- La forme A peut être convertie en forme B par passage sur DEAE cellulose (185-243) ou par simple conservation (246), mais la forme B ne peut pas être convertie en forme A.

- les formes A et B donnent naissance au même asialo-dérivé.

§ si l'on traite la forme B par la neuraminidase, et que l'on passe l'asialodérivé sur DEAE cellulose, la forme B diminue tandis que le pic A (ou "A like")augment parallèlement ; mais si l'on passe l'asialo dérivé de B sur une colonne de CM cellulose il n'est élué qu'avec une concentration saline supérieure à celle nécessaire à l'élution de A et cette concentration saline est identique à celle qui élue l'asialo dérivé de A (246)

§ par action de la neuraminidase, A et B donnent un asialo dérivé de même point isoélectrique 6,5 (246).

- les formes A et B ont une bonne stabilité thermique (42-112-243) (cette stabilité a été trouvée augmentée dans un cas de fucosidose (192)).
- les formes A et B ont des propriétés enzymatiques analogues (même pH optimal, même Km, mêmes actions des effecteurs : nous les développerons plus loin).
- les formes A et B présentent de grandes analogies immunologiques si ce n'est une identité complète (244-245) : en double immuno-diffusion radiale, le même arc de précipitation (avec du sérum de lapin anti-alpha-mannosidase hépatique B) est obtenu pour les fractions A ou B et la même quantité d'anticorps est nécessaire au blocage de 50 % de l'activité enzymatique A ou B. Cet anticorps ne réagit pas par contre, contre l'alpha mannosidase du plasma humain, mais précipite avec l'alpha mannosidase du cerveau, du rein et des leucocytes (144-245) ; il ne réagit pas avec l'alpha mannosidase du foie de boeuf. Les anticorps anti alpha mannosidase acide de rein de porc (199) réagissent eux avec l'alpha mannosidase de foie de boeuf donnant en double immunodiffusion radiale, un arc différent des deux arcs donnés par le rein de porc ; ces précipitations variables avec l'alpha mannosidase de foie de boeuf pourraient s'expliquer (199) par la participation de sous-unités différentes, à des taux variables à la structure des mannosidases.

Tous ces anticorps antienzymes sont, dans le cas de la mannosidase des anticorps précipitants qui ne bloquent pas l'activité enzymatique : ceci laisse supposer que les sites immunologiques et enzymatiques sont distincts et suffisamment éloignés.

- enfin les formes A et B sont à la fois absentes (38) ou au moins altérées (32) dans la mannosidose.

a.2. Les formes A et B diffèrent

- par leur contenu en acide sialique, ce qui permet leur séparation en fonction de leur charge :

§ par focalisation électrique forme hépatique A pI 5,9 - 6,1
forme hépatique B pI 5,4 (246)

§ par électrophorèse

§ ou par chromatographie d'échange d'ions.

- et par leur poids moléculaire :

§ l'alpha mannosidase hépatique B aurait un poids moléculaire supérieur à la A par filtration sur Sephadex G-200 (243) ou par centrifugation en gradient de densité (246).

forme A P.M. 220.000 $\pm$ 10.000

forme B hétérogène PM 300.000 $\pm$ 20.000
460.000 $\pm$ 20.000

la forme A serait la forme native.

§ l'alpha mannosidase A du rein (185) serait un tétramère de poids moléculaire 180.000 $\pm$ 4.500 constitué de deux chaînes lourdes (58.000 $\pm$ 600) et de deux chaînes légères (30.000 $\pm$ 380)

a.3. les propriétés enzymatiques

- influence du pH. Le pH optimal est voisin de 4 - 4,5 (8-13-119-120 185-191-243-246) selon le type et la molarité du tampon (8) utilisé.

- influence de la concentration des substrats. L'enzyme normale suit une cinétique du type Michaelis-Menten. Les substrats utilisés sont :

§ soit des substrats synthétiques

paranitrophenyl alpha D mannopyranoside

ou 4 methylumbelliferyl alpha D mannopyranoside,

les Km sont du même ordre pour les 2 substrats synthétiques et les formes A et B ont même Km.

- . rein forme A $K_m = 1,15 \text{ mM}$ (185)
- . leucocytes $K_m = 0,65 \text{ à } 1,80 \text{ mM}$ (8)
(l'enzyme est assez instable par préincubation à son pH optimal d'activité mais stabilisée par la présence du substrat).
- . fibroblastes $K_m = 1,78 \text{ mM}$ pour HULTBERG (119) à pH 4,5
 $K_m = 0,86 \text{ à } 0,96 \text{ mM}$ pour BEAUDET (13) à pH 4
- . foie selon les auteurs la K_m varie de $1,1 \text{ mM}$ (246)
à $2,5 \text{ mM}$ (124)

§ soit des substrats naturels

Les substrats utilisés sont les oligosaccharides isolés de l'urine de sujets atteints de mannosidose (et un pentasaccharide isolé de l'urine de mannosidose bovine) (124)

- . Man alpha (1 - 3) Man beta (1 - 4) Glc NAc: trisaccharide
- . Man alpha (1 - 2) Man alpha (1 - 3) Man beta (1-4) GlcNAc: tétrasaccharide
- . Man alpha (1 - 2) Man alpha (1 - 2) Man alpha (1 - 3) Man beta (1 - 4) GlcNAc: pentasaccharide

Pour PHILIPPS (246) la K_m pour le trisaccharide isolé de l'urine humaine est de $1,1 \text{ mM}$ et pour HULTBERG (124) de $5,5 \text{ mM}$; et la vitesse maximale théorique est plus grande pour le trisaccharide que pour les substrats synthétiques.

HULTBERG (124) a montré que l'alpha D mannosidase acide humaine coupe le mannose à l'extrémité non réductrice des oligosaccharides que celui-ci soit fixé en alpha 1,3, en alpha 1,2 ou même en alpha 1,6 sur le mannose précédent, mais la scission du mannose terminal fixé en alpha 1,6 sur le pentasaccharide isolé de l'urine de boeuf atteint de mannosidose se fait beaucoup moins bien que celle des oligosaccharides isolés de l'urine de mannosidose humaine et l'absence de mannose terminal fixé en alpha 1,6 dans la mannosidose humaine a conduit à penser que l'enzyme humaine est au moins in vivo, plutôt une alpha 1,2 et une alpha 1,3 mannosidase (294).

D'autre part, malgré une K_m identique pour les trois substrats isolés de l'urine humaine, l'hydrolyse est moins efficace quand la taille du substrat augmente (124).

Il semble que la forme A soit moins efficace que la forme B2 ; d'autre part, l'asialodérivé commun aux formes A et B est également efficace pour l'hydrolyse de ces oligosaccharides.

La spécificité de l' α D mannosidase pour l'aglycone est donc faible et la structure de l'aglycone affectera plus la vitesse d'hydrolyse que la K_m .

- Action des effecteurs :

§ les aldonolactones comme la D mannono 1 - 5 lactone (8) ou la D mannono 1 - 4 lactone (321) sont des inhibiteurs compétitifs.

§ le méthyl α D mannopyranoside est également inhibiteur (278)

§ l'EDTA, les ions Zn^{++} et Co^{++} sont les effecteurs les plus étudiés (8-42-71-124-243-244)

. L'EDTA inhibe l'enzyme non purifiée mais cette inactivation est réversible sous l'action des ions Zn^{++} . La purification de l'enzyme diminue ou même annule son action (243-244-246).

. Les ions Zn^{++} déplacent le pH optimal vers la zone acide (environ 0,5 unité pH en moins). Ils activent beaucoup l'enzyme impure (ils diminuent la K_m (71)), leur effet est par contre très faible ou inexistant après purification (243-244-246). En outre les ions Zn^{++} stabiliseraient l' α mannosidase dans les leucocytes (157).

. les ions Co^{++} inhibent les formes A et B (augmentent la K_m (71)) et déplacent le pH optimal vers les zones moins acides (0,5 unité pH en plus) (243) mais cette inhibition devient très peu évidente sur l'enzyme purifiée.

§ les autres effecteurs : ils ont été étudiés plus occasionnellement et ont parfois donné des résultats contradictoires.

. l' α mannosidase A du rein (185) serait activée par les ions Na^+ , Mg^{++} , le mercaptoéthanol, l'albumine et les gamma globulines humaines, serait inhibée par les inhibiteurs des thiols, les ions métalliques lourds, le sodium dodécylsulfate.

. l' α mannosidase des leucocytes (8) serait insensible à l'action du parahydroxymercuribenzoate, serait inhibé par les ions ferreux Fe^{++} , ferriques Fe^{+++} , cuivreux Cu^+ , manganèse Mn^{++}

b) la forme neutre C

- Elle semble totalement différente des formes acides tant sur le plan génétique (elle est peu ou pas affectée dans la mannosidose) que sur le plan structural.
- sa localisation subcellulaire est différente puisqu'elle est prédominante dans le cytoplasme.
- la forme C présente un pH optimal de l'ordre de 6,5 (243) pour les substrats synthétiques et des constantes de Michaelis tout à fait différentes des formes acides, mais, de façon surprenante, HULTBERG (123) rapporte que cette forme neutre est active sur les oligosaccharides à pH 4,5 (alors qu'elle a peu ou pas d'action sur eux à pH 6,5).
- Cette forme C est extrêmement thermolabile, n'est pas stabilisée par les ions cobalt (42) et est très instable en solution protéique diluée (243).

- la forme C ne se lie pas à la concanavalline A sepharose et est insensible à l'action de la neuraminidase (42)
- en focalisation électrique, elle présente un point isoélectrique de l'ordre de 5,45 (243) et un petit composant de pH optimal acide et de point isoélectrique 4,9.
- son poids moléculaire estimé sur Sephadex G 200 est de l'ordre de 350 à 400.000
- Immunologiquement elle est tout à fait indépendante des formes acides A et B.
- son activité n'est pas modifiée par les ions Zn^{++} ou l'EDTA bien que le zinc augmente légèrement l'activité à pH 5,5- 5 ; les ions cobalt augmentent nettement l'activité entre pH 5 et 7 avec un maximum d'effet à pH 5,5 - 6.

c) les formes intermédiaires

- dans le foie : (246)

Il semble qu'au pic C soit liée outre l'activité neutre, une activité intermédiaire de pH optimal 5,5. Elle est activée par les ions Co^{++} , et thermostable : elle serait donc révélée par activation par le cobalt après dénaturation thermique. Cette activité étroitement associée à l'activité neutre dont elle n'est pas séparable expliquerait que l'activité résiduelle dans le foie de mannosidose aurait un pH optimal de 6,5 pour PHILIPPS (246) et de 5,5 pour HULTBERG (124) ; l'activité de pH optimal 5,5 a été déterminée après filtration sur gel au cours de laquelle l'activité neutre (instable en solution protéique diluée) devait s'inactiver pour révéler la forme intermédiaire.

- dans les liquides biologiques :

L'étude de l'influence du pH et de l'action des ions Zn^{++} et Co^{++} permet d'y mettre en évidence 2 fractions (41).

§ une acide de pH optimal 4,2 - 4,5 activée par les ions Zn^{++} (par suite de la diminution de la K_m).

§ une intermédiaire S de pH optimal 5,4 - 5,6 activée par les ions Co^{++} (qui provoquent une diminution de la K_m).

Le sérum contient peu de fraction acide et beaucoup de fraction S, le liquide céphalo-rachidien des proportions voisines, l'urine, elle, renferme plus de forme acide.

HULTBERG (125) a résumé quelques unes des propriétés caractéristiques des alpha mannosidases (tableau 2). Il distingue :

- dans le sérum (et les liquides biologiques) des formes acides et une forme intermédiaire .
- dans les tissus : des formes acides A et B, une forme neutre C et une forme intermédiaire I liée à la forme C, et enfin suggère la possibilité de l'existence d'une forme non soluble G attachée aux membranes de l'appareil de Golgi qui n'a pas été étudiée chez l'homme, mais qui a été mise en évidence dans le foie de rat (72-312).

4° Ontogénie

Le placenta et le foie foetal présenteraient la même sensibilité au pH que le foie adulte ; l'activité, mise en évidence dès la 5ème semaine de gestation, augmente jusqu'à la 12ème semaine, puis diminue en fin de grossesse. (330).

Dans les cellules amniotiques non cultivées (63) il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'âge de la grossesse et l'activité de l'enzyme qui présente un pH optimal de 4. Le diagnostic prénatal serait donc possible, sur les cellules amniotiques non cultivées, mais du fait de l'hétérogénéité et de la viabilité incontrôlée de ces cellules, on leur préfère l'étude des cellules amniotiques cultivées.

TABLEAU 2

FORMES ENZYMATIQUES MULTIPLES DE L'ALPHA D MANNOSIDASE
(tableau emprunté à HULTBERG (125))

	Formes acides (pH optimal 3,8 - 4,5)	Forme neutre (pH optimal 6,0 - 6,5)	Formes intermédiaires (pH optimal 5,2 - 6,0)
			Forme S : Forme I : Forme G :
Chromatographie sur DEAE cellulose	- A, B1 et B2	C	Coélue avec A, B1 et B2 : Coélue avec C : non étudiée :
chromatographie sur concanavalline A Sépharose	adsorbée	non adsorbée	adsorbée : non adsorbée : non étudiée :
action de la neuraminidase	donnent un seul précurseur	sans effet	donne un précurseur (idem A, B1, B2) : sans effet : non étudiée :
action de la chaleur (60° C)	↘ 10 - 20 %	↗ 60 - 80 %	↗ 60 - 80 % : sans effet : la labilité dépend de l'état de solubilisation :
action des ions Co++	↘ 10 - 30 %	↗ 2 à 3 fois	↗ 6 à 10 fois : sans effet : sans effet :
effet du méthyl-alpha mannopyranoside	↘ 40 - 50 %	sans effet	sans effet : sans effet : sans effet :

- dans le liquide amniotique, l'activité est très faible (33-330) : le liquide présente un pic relativement important vers 25 semaines (33). Plus précocement (entre la 12e et la 17e semaine de gestation), on peut trouver des taux extrêmement faibles.

Après avoir tenté de faire le point des connaissances actuelles sur les alpha mannosidases, nous nous intéresseront plus spécialement aux formes acides A et B humaines et à leur lieu d'action : le lysosome.

I.3. - LES LYSOSOMES (308-102-58)

L'existence des lysosomes, corpuscules lytiques ou digestifs, a été établie par DE DUVE et ses collaborateurs en 1955 en étudiant la phosphatase acide de foie de rat.

En microscopie électronique, ces lysosomes apparaissent comme des organites intracellulaires limités par une membrane simple qui empêche l'action des enzymes digestives qu'ils contiennent sur le cytoplasme.

Le caractère le plus remarquable de ces organites est leur hétérogénéité tant en ce qui concerne leur taille que leur structure interne ou les quantités et proportions des enzymes qu'ils contiennent (55).

I.3.1. - La digestion lysosomiale :

Les lysosomes sont capables de digérer la grande majorité des substances de l'organisme et seule la configuration spéciale de la face interne de la membrane de ces organites lui permet de résister à cette digestion. Ainsi les lysosomes peuvent s'attaquer à des substances extérieures à la cellule (phénomène d'hétérophagie), à des substances de la cellule elle-même (phénomène d'autophagie) ou à des grains de sécrétion de cette cellule (phénomène de crinophagie qui est une forme particulière de l'autophagie).

Nous avons déjà rappelé que les hydrolases acides achèvent leur synthèse au niveau de l'appareil de Golgi d'où se détachent, selon la théorie classique, des vésicules riches en enzymes : les lysosomes primaires :

Ces lysosomes primaires vont ensuite fusionner :

- soit entre eux,
- soit avec des vacuoles contenant des substances à dégrader, donnant naissance à des lysosomes secondaires,
- soit avec des lysosomes secondaires ayant déjà effectué une ou plusieurs digestions.

Il semble bien que ces mouvements, aboutissant à des fusions, ne se fassent pas au hasard, mais que ces vacuoles se meuvent à proximité d'un système de microtubules constituant des chemins préférentiels à l'intérieur de la cellule (95).

Pour DE DUVE, le phénomène clé de tous ces passages de vacuole à vacuole est la fusion de membranes dont on connaît actuellement très peu de choses mais qui nécessite sans doute des systèmes de reconnaissance spécifiques et des dépenses énergétiques.

Après plusieurs digestions, les lysosomes arrivent à se charger de résidus non digestibles; les corpuscules résiduels ayant peu à peu perdu leurs activités enzymatiques persistent généralement dans le cytoplasme (post-lysosomes) sauf, dans certaines cellules, d'où ils sont éliminés à l'extérieur par exocytose.

Les substances qui pénètrent dans le système vacuolaire peuvent provenir de l'extérieur ou de l'intérieur de la cellule.

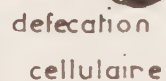
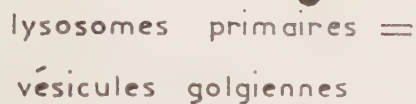
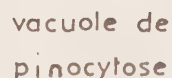
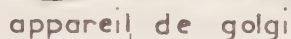
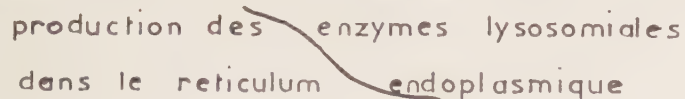
- lors de l'hétérophagie, les matériaux extracellulaires vont être reconnus probablement par des récepteurs spécifiques ; la membrane cellulaire va s'invaginer, fusionner par la face externe pour donner dans le cytoplasme une vésicule appelée hétérophagosome. Ce phénomène d'endocytose prendra selon la taille des particules captées le nom de phagocytose (grosses particules) ou de pinocytose.

- Lors de l'autophagie, De DUVE suppose soit que la membrane du lysosome lui même s'invagine, soit qu'il y a formation préalable d'un autophagosome qui fusionne ensuite avec un lysosome (les membranes de cet autophagosome proviendraient du réticulum endoplasmique dont les feuilletts s'accoleraient pour donner une membrane unique).

- lors de la crinophagie, le contenu des grains de sécrétion est déchargé par fusion directe avec les lysosomes et ce phénomène joue probablement un rôle dans la régulation des fonctions sécrétrices.

LE FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL LYSOSOMIAL d'après DE DUVE (58)

Figure 5



L'ensemble de ces phénomènes est résumé dans la figure 5.

I.3.2. - L'hétérogénéité des lysosomes (55-202)

Les lysosomes ont été étudiés dans de nombreux tissus : ils présentent d'importantes différences d'un tissu à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'un même tissu.

Des différences de densité et de propriétés physiques ont été mises en évidence dans les lysosomes de foie de rat en fonction de leur origine : fœtus, nouveau-né ou adulte.

Les variations de taille et de densité des lysosomes sont aussi certainement reliées aux changements dynamiques qui ont lieu entre vacuoles d'endocytose et lysosomes primaires. Une grande variété de lysosomes primaires et surtout secondaires, contenant divers types de matériel ingéré à des stades de digestion plus ou moins avancés, a pu être isolée et il semble probable que le matériel ingéré influence notablement l'équilibre de densité des particules lysosomiales.

D'autre part, le contenu enzymatique des lysosomes est extrêmement hétérogène. Diverses causes ont été invoquées pour expliquer cette constatation :

- l'âge des lysosomes isolés est variable et les lysosomes vieillissants sont moins riches en hydrolases acides et l'instabilité de ces enzymes dans le temps varie de l'une à l'autre.

- La synthèse des hydrolases acides n'est pas régulière et peut être stimulée sous diverses influences ; il en résulte que, selon le moment de leur formation, les lysosomes seront plus ou moins riches en hydrolases.

II - LA MANNOSIDOSE

ANOMALIE DU CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES

II.1. LES THESAURISMOSES LYSOSOMIALES (308-58-102)

Elles sont très nombreuses et peuvent survenir chaque fois qu'il existe un déséquilibre qualitatif ou quantitatif entre les substrats qui pénètrent dans les lysosomes et les hydrolases chargées de les digérer.

L'anomalie peut se situer selon les cas au niveau des substrats ou des hydrolases. Il peut s'agir :

- de substances indigestibles pour lesquelles il n'existe pas normalement d'hydrolase
- de substances normalement digestibles mais dont l'enzyme chargée de la digestion est génétiquement absente ou anormale
- ou plus rarement d'un substrat normalement digestible mais dont l'apport excessif déborde les capacités de dégradation enzymatique.

Nous ne nous intéresserons qu'au deuxième cas, c'est à dire aux surcharges dues à l'anomalie ou à l'absence d'une hydrolase.

L'évolution de la maladie sera progressive et sans rémission prévisible, les lysosomes se chargeant peu à peu de la substance ou du groupe de substances non dégradées. La maladie peut donc passer inaperçue à la naissance et les malades développeront les symptômes progressivement à une vitesse qui dépend de la nature et de l'abondance du matériel stocké ainsi que de son site d'accumulation préférentiel. Mais, si la regression du développement psycho-moteur constitue souvent un signe capital, il faut se rappeler qu'il existe une grande variabilité dans l'âge de début et dans la sévérité des manifestations cliniques observées.

Enfin, la liaison entre la surcharge, la souffrance cellulaire et les symptômes n'est pas évidente et très souvent il n'y a pas de relation entre l'importance du déficit et la gravité de la maladie.

L'observation en microscopie électronique de lysosomes hypertrophiés permet d'affirmer le diagnostic de maladie de surcharge lysosomiale ; ces lysosomes se présentent comme de grandes vacuoles limitées par une membrane simple et remplies de matériel non digéré.

Les maladies lysosomiales d'origine génétique affectent tous les types cellulaires dans lesquels l'enzyme anormale est contrôlée par le même gène. C'est pourquoi, il s'agit très souvent de maladies généralisées, mais cette constatation doit être modulée.

Caractères des dépôts intralysosomiaux :

- caractère quantitatif

L'abondance des dépôts intracellulaires va dépendre de divers facteurs :

. Elle varie avec l'intensité des phénomènes d'autophagie (l'autophagie est la principale source de matériel non digéré dans les cellules musculaires et les neurones qui ont une faible activité d'endocytose), de crinophagie et d'hétérophagie (l'hétérophagie explique le dépôt de matériel non synthétisé par les cellules atteintes mais présent dans le courant circulatoire).

. Elle est influencée par la capacité de chaque cellule d'éliminer des substances non digérées par exocytose (mais ce phénomène est extrêmement limité chez les organismes supérieurs).

. Enfin l'abondance des dépôts dépend de la durée de vie de la cellule. Certaines cellules se renouvellent fréquemment et présentent rarement des signes de surcharge à moins qu'elles ne soient le siège d'une endocytose intense. Ainsi, dans la mannosidose, JOLLY et THOMPSON (143) expliquent les anomalies observées au niveau des cellules exocrines (dont la vie n'est pas

particulièrement longue) par leur grande activité d'endocytose. D'autres cellules, au contraire à vie très longue (coeur et cerveau) présenteront presque toujours des signes de surcharge. Il est d'ailleurs fatal, même en l'absence de déficit enzymatique, que des cellules acquièrent de temps à autre des molécules altérées ne pouvant être digérées : il se produit donc un encombrement lent mais inévitable des lysosomes lors du vieillissement des cellules à vie longue.

- caractères qualitatifs

Le matériel stocké est souvent hétérogène car les enzymes hydrolytiques sont généralement plus spécifiques d'un type de liaison chimique que d'un type de molécule. Cette hétérogénéité peut être compliquée par l'accumulation secondaire de substances qui ne contiennent même pas la liaison chimique impliquée, le matériel stocké pouvant lui-même inhiber d'autres enzymes lysosomiales (ainsi la surcharge du foie en mucopolysaccharides entraîne une inhibition secondaire de la Beta-galactosidase acide).

Cette hétérogénéité du matériel stocké explique certaines difficultés de classification : ainsi la gangliosidose à GM1 présente outre la surcharge en ganglioside GM1, des surcharges en mucopolysaccharides et oligosaccharides. Cette hétérogénéité varie en fonction des organes. Ainsi, les neurones presque incapables d'hétérophagie se chargeront plutôt en glycolipides tandis que les mucopolysaccharides s'accumuleront préférentiellement dans le tissu hépatique.

Lors du déficit d'une hydrolase acide, l'hyperactivité secondaire d'autres hydrolases s'observe fréquemment. L'explication de ce phénomène n'est pas simple, car toutes les enzymes ne sont pas augmentées en proportion identique et on ne peut donc pas évoquer une hypertrophie globale du système lysosomal ; selon HERS (106) l'explication la plus probable est que le matériel stocké présente une affinité pour certaines hydrolases acides qu'il protège contre la dénaturation thermique ou la digestion par les cathepsines.

Pour VAN HOOFF (317), 4 critères principaux permettent de définir une maladie comme une maladie congénitale de surcharge lysosomiale :

- 1 - cette maladie est une thésaurismose
- 2 - les diverses substances accumulées sont localisées dans les vacuoles lysosomiales (microscopie électronique)
- 3 - ces substances peuvent être détruites par un extrait de lysosomes normaux
- 4 - une des enzymes nécessaires à cette digestion est absente congénitalement.

II-2. - LA MANNOSIDOSE

II.2.1. - Les cas faisant l'objet de notre travail

Cas N° 1 : Professeur M. HERMIER - Service de Pédiatrie du Pr. R. FRANCOIS -
Hôpital Edouard Herriot - H.C.L.

Saliha B. est née le 15 octobre 1972 au terme d'une grossesse sans problème de parents algériens, cousins germains. L'enfant sourit à 3 mois, s'assied à 8 mois et ne marchera qu'à deux ans et demi.

Au cours de l'année 1974, Saliha est vue plusieurs fois en consultation pour des épisodes de rhinopharyngites et bronchites à répétition. (au moins une à deux fois par mois). On remarque en outre chaque fois :

- un faciès dysmorphique inexpressif avec un grand front bombé, une racine du nez élargie et aplatie, un hypertélorisme, un menton petit un peu en retrait,

- un retard psychomoteur net

- un retard de la marche

- une hypotonie généralisée

- une petite splénomégalie

- des écchymoses ou des taches purpuriques

- et une discrète anémie hypochrome.

Les radiographies osseuses font apparaitre une ostéoporose majeure diffuse sans épaississement de la corticale des os longs qui est attribuée à un rachitisme ancien en voie de guérison.

Elles révèlent également un épaississement de la voûte du crane et un aspect un peu trapu de certains os en particulier des côtes.

Hématologie : En décembre 1974, une lame de sang pratiquée lors d'une consultation montre que "pratiquement tous les lymphocytes possèdent de nombreuses vacuoles qui contiennent parfois une fine granulation azurophile" (service d'hématologie du Professeur D. GERMAIN - Hopital Edouard Herriot - Lyon). L'enfant est hospitalisée en février 1975 pour bilan de maladie de surcharge.

Cliniquement, on retrouve les mêmes anomalies que celles précédemment signalées :

- une dysmorphie faciale peu intense mais indiscutable,
- le retard psychomoteur
- l'absence d'acquisition de la parole
- le retard d'acquisition de la marche puisque celle-ci n'est acquise qu'après 2 ans 1/2; on note alors un élargissement du polygone de sustentation et l'enfant traine la jambe gauche.
- une petite hépatomégalie
- une petite rate dure
- une hypotonie globale.

Les examens radiologiques révèlent :

- un aspect réticulé et une corticale fine au niveau des phalanges et des métacarpiens
- une trame un peu grillagée spongieuse des cols fémoraux
- un aspect incurvé des os de l'avant bras
- des côtes trapues un peu élargies
- une voûte du crane épaisse avec hyperdensité surtout au niveau de la base.

Le myélogramme (service d'hématologie du Professeur D. GERMAIN H.E.H.) montre "un contingent lymphoïde qui ne parait pas présenter de lymphocytes vacuolés mais il existe des éléments d'allure plasmocytaire renfermant de grosses vacuoles de surcharge".

Examens biologiques :

- les immunoglobulines sériques sont normales
- les mucopolysaccharides urinaires ne sont pas augmentés
- par contre, nous avons pu mettre en évidence dans les urines par la technique de screening de HUMBEL (129-130), des spots d'oligosaccharides de RF inférieur au lactose du type de ceux observés dans la mannosidose.
- enfin, parmi les hydrolases acides que nous avons testées dans les leucocytes, seule l'alpha-D-mannosidase présente une activité effondrée.

L'Examen ophtalmologique réalisé en mai 1978 (service du Professeur HUGONNIER - H.E.H.) ne révèle ni opacités du cristallin, ni surcharge cornéenne à l'examen à la lampe à fente.

L'examen audiolgique difficile à réaliser (Docteur MORGON - H.E.H. 1978), confirme l'existence d'une demi-surdité.

Evalution actuelle (mai 1978) : à l'examen clinique, on retrouve l'hépatosplénomégalie, la démarche un peu ataxique avec rotation interne du pied ; enfin, l'enfant âgé de près de 6 ans, totalement apathique ne parle pas et son placement en milieu spécialisé est envisagé.

Cas N° 2

Farida B. est la soeur aînée de Saliha. Elle est née le 27 octobre 1971 après une grossesse et un accouchement sans problème.

L'enfant est hospitalisée en novembre 1974 pour bronchopneumopathie. Dans les antécédents, on relève la fréquence des bronchites asthmatiformes ; on remarque d'autre part un retard psychomoteur important, une petite rate et un metarsus varus bilatéral entraînant des troubles de la marche et motivant une consultation orthopédique.

En Juin 1975, Farida est hospitalisée pour bilan de mannosidose

A l'examen clinique on note :

- un facies inexpressif,
 - un front large bombé,
 - une racine du nez aplatie,
 - un hypertélorisme,
 - et un menton un peu en retrait,
-
- un retard psychomoteur important (niveau évalué à 21 mois au test de Brunet-Lezine pour un âge légal de plus de 4 ans),
 - un retard de langage : l'enfant ne parle pas,
 - les troubles de la marche ne sont que ceux occasionnés par le metatarsus varus bilatéral.

On remarque également :

- une petite rate ferme
- et une hypotonie assez importante.

Examen hématologique (service du Professeur GERMAIN - H.E.H.) "le sang périphérique montre de nombreux lymphocytes vacuolés (50 %) dont certains (4 à 5 %) contiennent de volumineuses granulations" ; la moelle montre un "petit contingent lymphoïde qui comporte quelques lymphocytes vacuolés avec quelques cellules de surcharge dont certaines paraissent plus plasmocytaires qu'histiocytaires".

Examens biologiques

- les immunoglobulines sont normales comme chez sa soeur
- la chromatographie en couche mince des urines par la technique de HUMBEL nous a permis de révéler des spots caractéristiques d'oligosaccharides
- et nous avons confirmé le déficit en alpha-D-mannosidase dans les leucocytes.

l'examen audiolgique (Docteur MORGON - H.E.H.) de réalisation difficile objective une demi-surdité déjà notée en mars 1976.

l'examen ophtalmologique à la lampe à fente (Professeur HUGONNIER H.E.H.) ne montre ni surcharge cornéenne, ni opacité du cristallin.

Evolution : à la dernière consultation (mai 1978), on retrouve à l'examen clinique, une petite hépatosplénomégalie indolore, un retard psychomoteur important ; l'enfant est apathique et ne parle pas à l'âge de 7 ans bientôt ; on note enfin, un état dentaire désastreux. Comme pour sa soeur, un placement en milieu spécialisé est envisagé.

Diagnostic Prénatal

A l'occasion de la 4ème grossesse de la mère, une amniocentèse précoce a été réalisée fin mars 1976 (16ème semaine d'amenorrhée) (Docteur MEUNIER - service du Professeur MAGNIN - H.E.H.). Nous avons diagnostiqué un foetus atteint de mannosidose ; un avortement thérapeutique a été réalisé le 22 Mai 1976. Nous avons confirmé le diagnostic de mannosidose sur le produit d'avortement par la mise en évidence de l'anomalie enzymatique (fibroblastes, foie, placenta...). Le foetus mâle de 550 g ne présentait aucune malformation externe, ni de malformations macroscopiques des organes examinés (Docteur H. CARRIER - service du Professeur TOMMASI - Hôpital Neurologique).

Il n'a pas été noté d'anomalies du cerveau ou du cervelet (Professeur TOMMASI).

Les reins (droit et gauche), le myocarde, le foie, le placenta, la rate, le poumon et le pancréas n'ont pas montré de cellules de surcharge ou d'autres anomalies aux colorations standard trichromiques et PAS (Docteur J.GILLY).

Fratrerie

Une quatrième grossesse (au cours de laquelle il n'a pas pu être pratiqué d'amniocentèse) a donné naissance le 10 février 1978 à deux jumeaux Mohammed et Jaliha. Nous n'avons pas retrouvé, dans les urines de ces nouveaux-nés, de spots d'oligosaccharides par le test de screening de HUMBEL et l'alpha-D-mannosidase dans les leucocytes présentait une activité comparable aux contrôles.

L'enquête génétique (Docteur VOTAN-BONNAMOUR - Professeur J.M. ROBERT service de génétique médicale - Hôtel Dieu Lyon), a mis en évidence une consanguinité élevée chez les parents : les parents, venant d'Algérie, sont cousins germains (le grand père paternel et la grand mère maternelle sont frère et soeur). D'autre part, les grands parents paternels sont eux mêmes cousins germains et les grands parents maternels présentent également une consanguinité certaine bien que plus éloignée. Enfin les deux familles de grands parents sont probablement consanguines bien que ce fait n'ait pas pu être établi avec certitude (figure 6).

La fratrie du père comprend 7 frères en bonne santé, un frère décédé à l'âge de 4 mois et 6 soeurs en bonne santé dont 4 ont des enfants. La fratrie de la mère comprend 3 soeurs et 4 frères en bonne santé et 2 soeurs et 3 frères décédés en bas-âge. On ignore les causes des décès dans les 2 fratries.

Cas n° 3

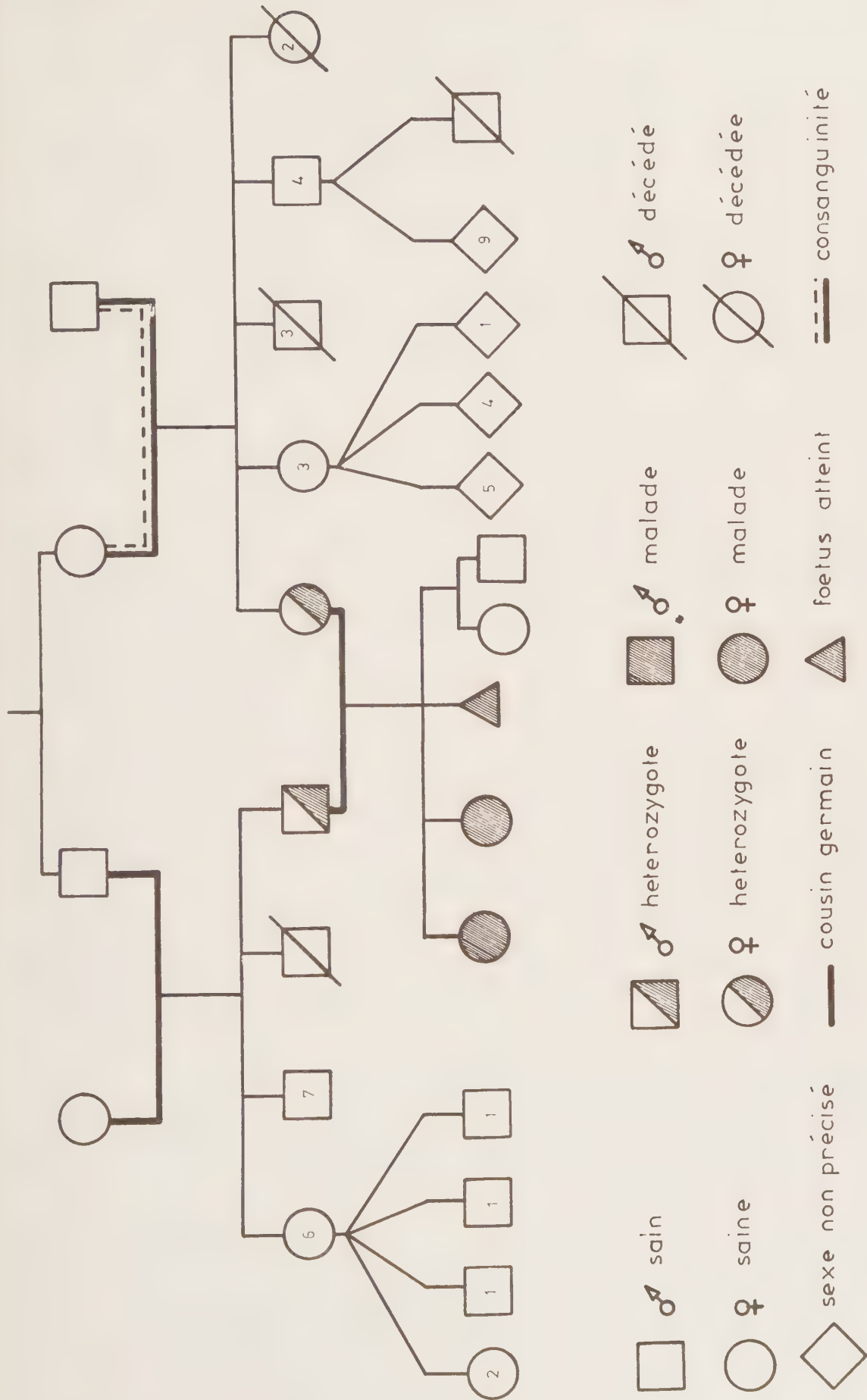
Service du Professeur SCHOTT - Hopital Neuro-cardiologique - H.C.L.
Sylvie N..

Nous avons eu tout recemment en Juillet 1978, la possibilité de diagnostiquer un nouveau cas de déficit en alpha-D-mannosidase : Sylvie N. née le 12.1.1975 de parents français a été hospitalisée en Juillet 1978 à l'hôpital Neurologique pour un problème de craniosténose. On trouve chez cette enfant un facies dysmorphique, une débilité mentale, une surdité probable, une microcéphalie. La présence d'oligosaccharides dans les urines (test de screening de HUMBEL) et le déficit en alpha-D-mannosidase acide dans les leucocytes nous ont permis de faire le diagnostic.

La fratrie comprend :

- un frère en bonne santé
- et une soeur débile, sourde, microcéphale, opérée d'une craniosténose récidivante sévère et qui présente très probablement également une mannosidose que nous n'avons pas encore pu confirmer biologiquement.

FIGURE 6



ENQUETE GENETIQUE FAMILLE B. (Dr. Votan Bonnamour - Pr. J.M. Robert)

II.2.2. - Revue des cas de la littérature

Nous avons pu répertorier au 1er août 1978 68 malades (tableau 3) compte tenu des cas qui font l'objet de notre étude.

FARRIAUX (87) et VIDGOFF (322) en 1977 ont colligé un peu plus de quarante observations et abouti à définir un tableau clinique de cette affection ; les publications ultérieures que nous avons pu analyser ne font que corroborer le tableau décrit dont nous rapportons les principaux éléments :

a) La Clinique

La maladie débute après un intervalle libre que l'on peut estimer dans la plupart des cas à un an environ et les premiers éléments sont généralement retrouvés à posteriori par l'interrogatoire. Le diagnostic est donc exceptionnellement précoce (cas de DREYFUS (79) diagnostiqué à 6 mois et demi) et il peut même être tardif (1 des cas de BOOTH (23) diagnostiqué à 26 ans).

Il ressort du tableau 4 que les signes les plus constants sont la dysmorphie faciale, le retard mental, les troubles du langage et aussi la surdité. La notion d'infections récidivantes semble également retrouvée avec une grande fréquence. D'autres signes sont encore signalés avec une fréquence notable : les hernies, l'hépatomégalie (plus souvent que la splénomégalie). L'examen ophtalmologique (tableau 5) à la lampe à fente révèle dans un certain nombre de cas (13 fois sur 56) des opacités du cristallin et il semble que ces dernières, quand elles sont présentes, soient assez caractéristiques (2-165-210).

En ce qui concerne l'évolution, le pronostic vital semble bon puisque, seul, le malade d'OCKERMAN (223) est décédé à l'âge de 4 ans 4 mois ; par contre, le retard mental et la dysmorphie faciale semblent s'aggraver avec l'âge.

Le syndrome dysmorphique :

- la dysmorphie faciale est présente dans tous les cas avec une intensité variable ; elle est dite "Hurler-like", mais est beaucoup plus discrète

REVUE DES CAS DE LA LITTÉRATURE

N°	Auteurs	Année Public	Sexe	Nbre de Familles	consan- guinité	Revue Vidgoff 1977	Revue Farriaux 1977	Références
1	OCKERMAN	1967	1M	1		+	+	30-81-117-158- 223 à 231
2	ROMANO	1971	1F	1		+		260 (cité par Vidgoff)
3-4	ORMOS- NORDEN	1971- 73	2F	1		+	+	217-236
5-7	AUTIO	1973	3M	2		+	+	5-6
8-10	AUTIO	1974	3M	3			+	6-7
11	TSAY- MATALON	1974	1M	1		+	+	305-306-308
12-13	LOEB- TONDEUR	1969- 75	1M 1F	1		+	+	172-315
14	AYLSWORTH TAYLOR	1975	1M	1		+	+	9-302
15-17	BOOTH - NADLER	1975	2F 1M	1		+	+	23-24
18	BEAUDET	1975	1M	1	+	+	+	12-13-210
19	PERELMAN	1975	1F	1	+	+	+	79-241
20	DREYFUS	1975	1M	1		+	+	79
21	MAROTEAUX	1975	1M	1		+	+	79-187
22-33	SPRANGER	1975	6F 6M	8	+	+	+	90-284
34-38	FARRIAUX	1975	3M 2F	3	+	+	+	85 à 88

TABLEAU 4

LES CAS DE LA LITTERATURE - SIGNES CLINIQUES

N°	Dysm. faciale	Retard Mental	Surdité	Tr. du langage	Infections fréquentes	Hépato m�galie	Spl�no m�galie	Hernies
1	1/1	1/1		1/1	1/1	1/1 puis 0/1	1/1 puis 0/1	0/1
3-4	2/2	2/2		1/2	1/2	2/2	1/2	0/2
5-7	3/3	3/3	1/3 + 1 ?	3/3	3/3	0/3	0/3	2/3
8-10	3/3	3/3	3/3		3/3	0/3	0/3	
11	1/1	0/1				1/1	1/1	0/1
12-13	2/2	2/2	2/2		2/2	0/2	0/2	
14	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
15-17	3/3	3/3	2/3	3/3 (2retards + 1 muet)	2/3	0/3	0/3	2/3
18	1/1	1/1				1/1	1/1	
19	1/1	1/1	?/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1
21	1/1							1/1
22-23	12/12	12/12	8/10	8/8	3/12	7/12		7/12
34-38	5/5	4/5 + 1 trouble du comportement	¹ / ₄ 5	4/5	1/5	0/5	0/5	1/5
39	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
40-43	4/4	4/4	4/4		3/4	0/4	0/4	
44-45	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
46-48	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3
49-53	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	1/5	5/5
54	1/1		1/1			0/1	0/1	
55-57	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3		1/3
58-59	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	1/2	1/2
60-61	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
65-66	1/1							
67	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1			
	61/61	57/58	40/51	37/40	34/56	27/58	15/43	25/46
	100%	98 %	+6?	93 %	59 %	46 %	34 %	54 %
			78 %					

que dans les mucopolysaccharidoses et progresse beaucoup plus lentement. Une macrocéphalie a été décrite dans un bon nombre de cas (un des deux cas de LOEB, 3 cas sur les 12 de SPRANGER, 4 malades sur les 5 de FARRIAUX, la malade de IKONNE, et 1 malade sur les 5 de YUNIS) avec une déformation habituelle de type brachycéphale (due à une synostose prématurée des sutures) ; néanmoins on a pu voir 2 cas de microcéphalie (notre dernier malade décrite et un cas de ARBISSER) ; les traits sont grossiers, le visage plat avec un front large souvent bombé, une ensellure nasale prononcée, un nez aplati et large ; les yeux sont écartés ; les lèvres sont épaisses et l'on a pu relever des macroglossies (cas n° 1 - 13 - 58), une hypertrophie gingivale (cas n° 19 - 58) ; les dents sont généralement décrites comme largement écartées, carriées, et même parfois mal implantées (172-182-210-223-322) .

- la dysmorphie des autres parties du corps est généralement assez discrète : chez certains on a pu observer comme dans les autres mucopolysaccharidoses une croissance accélérée puis ralentie (2-5-210-217-225-322-329) aboutissant à un retard de taille toujours modéré, parfois accompagné d'une cyphose ou d'une cyphoscoliose (5-9-23-85-172-203-223-241).

Les observations relèvent souvent un abdomen protubérant mais l'hépatosplénomégalie est un signe inconstant ; quand elle existe, elle est assez peu importante et, de façon curieuse, dans certains cas transitoire (157-203-223-339) ; l'hépatomégalie est plus fréquente que la splénomégalie.

De nombreux cas présentent des hernies (5-6-9-87-322-339) surtout ombilicales mais aussi inguinales (157) et quelques uns des hydrocèles testiculaires (5-9-157-322). Divers auteurs soulignent l'hypotonie globale de leurs malades (5-24-85-158-181-284-322).

Les articulations sont parfois raides (10-90-172-210-241) mais souvent parfaitement normales ; les mains sont généralement décrites comme longues et effilées mais aussi parfois comme larges et trapues.

Le retard mental :

est extrêmement variable dans son intensité. Il est d'installation plus ou moins précoce, lentement progressif mais semble conduire dans tous les cas de malades âgés à une débilité profonde. La seule observation qui ne le retrouve pas est celle de TSAY (305) mais le malade n'avait que 10 mois 1/2 ; d'autre part, un cas de FARRIAUX, ayant évolué normalement jusqu'à 4 ans, commence à présenter des troubles du comportement.

Le début semble se manifester par un retard des acquisitions en particulier de la marche. Certains auront une démarche anormale avec élargissement du polygone de sustentation (157-181-203-339) ou ne marcheront pas (2).

Malgré quelques cas de comportement agressif (85) ou agité (158-223) ou psychotique (24), les malades sont généralement calmes et un désintérêt progressif aggravé par la surdité, semble s'installer. (nos cas 44 et 45)

La surdité :

plus ou moins profonde et signalée dans au moins 3/4 des cas mais son installation semble se faire à un âge variable ; son existence et son intensité sont souvent difficiles à évaluer. Cette surdité joue sans doute un rôle important dans les troubles du langage.

Les troubles du langage :

sont signalés dans la plupart des observations (5-24-85-157-172-181-203-223-241-284-339) : il peut s'agir d'un retard d'acquisition ou de développement du langage ou d'un vocabulaire incompréhensible (5) ; enfin certains malades sont muets (1 cas de BOOTH (24) 2 cas de YUNIS (339) et nos cas 44 et 45).

Les infections récidivantes

sont signalées dans près de 60 % des observations (34 cas sur 56). Elles ne présentent pas de caractère particulier et concernent surtout la sphère ORL. Dans quelques cas, elles ont trouvé une explication dans la diminution des immu-

noglobulines (5-131-223-)ou (et) dans les fonctions leucocytaires altérées (71) mais MILLA (203) ne retrouve pas ces anomalies chez un malade présentant de telles infections récidivantes.

L'examen cardiovasculaire est normal (sauf dans le cas initial d'OCKERMAN (158) et 2 cas d'ARBISSER (2)) ainsi que l'examen pulmonaire en dehors des épisodes fréquents d'infections pulmonaires : A l'exception des problèmes d'hypotonie, des troubles de la marche et de la maladresse de certains enfants, l'examen neurologique est normal également.

Les anomalies oculaires

(2-165-210) décrites sont des opacités du cristallin : cataractes ponctuées (2-165-210) ou en "rayon de roue" (2-5-9-90-158-284) qui seraient assez caractéristiques de la maladie. Des opacités cornéennes ont été décrites dans 2 cas (236) et ARBISSER (2) signale dans 2 cas des anomalies du système vasculaire rétinien.

Les fibroblastes du stroma conjonctival semblent présenter un aspect typique de surcharge en microscopie électronique (169-170-320).

DISCHE (78) et SPIRO (280) ont mis en évidence dans le cristallin des glycoprotéines contenant du mannose ; CARLIN (36-37) et DREYFUS (80) étudiant l'alpha-D-mannosidase du cristallin ont montré que son activité à pH acide étant normalement très faible, il était difficile de supposer que le métabolisme local contribuait seul à la formation de la cataracte.

Devant la variabilité des tableaux présentés par les divers malades, DESNICK (71) suggère de distinguer 2 types de mannosidoses :

- un type sévère caractérisé par une hépatosplénomégalie, des infections récidivantes importantes et une démence précoce.
- un autre type d'évolution moins sévère avec survie à l'âge adulte, retard mental, perte de l'audition et dysostose multiple.

TABLEAU 5

LES CAS DE LA LITTÉRATURE EXAMENS PARACLINIQUES

1 = voûte épaissie
2 = cranio synostose
3 = côtes élargies

4 = vertèbres ovoïdes ou aplaties
5 = defect antero supérieur d'ossification
(vertèbres en éperon)

N°	OPHTALMOLOGIE		RADIOLOGIE					HEMATOLOGIE		ANATOMO-PATHOLOGIE	
	Opacités Cornée: Cris- tallin		Crane	côtes	vertèbres	cellules de surcharge		microscopie			
			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	sang	Moelle	optique	électronique
1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	Foie-Rate	
										cerveau.	
										Nodules	
										Lymphatiques	
3-4	2/2	0/2	2/2	0/2		2/2	0/2	2/2	2/2		foie 1/2
5-7	0/3	2/3	3/3	1/3		1/3	2/3	3/3	3/3	Muscle 1/3	foie 2/3
						osteo:					
						chon-					
						drose:					
8-10	0/3	0/3	dysostoses multiples					0/3			
11	0/1	0/1	dysostoses multiples 1/1					0/1			
12-13	0/2	0/2	2/2		1/2	2/2		2/2		Foie 2/2	conjonctive 2/2 Foie 2/2
14	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	-		
15-17	0/3	0/3	3/3	0/3		0/3	0/3	-	-	-	-
18	-	-	dysostoses multiples					-	-	-	-
19	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	Foie 1/1	Foie 1/1
										Intestin 1/1	intestin 1/1
21	-	-	1/1				1/1	-	-	-	-
22-33	0/12	1/12	5/10		2/4	10/12	11/12	8/9	5/5	-	-
34-38	0/5	0/5	5/5	5/5	1/5	5/5	5/5	4/4	1/1		conjonctive 3/5
39	0/1	0/1	1/1				1/1	1/1	1/1		foie 1/1
40-43	0/4	4/4	dysostoses multiples					4/4	-	-	-
44-45	0/2	0/2	1/1		1/1			2/2	2/2	-	-
46-48	0/3	3/3	3/3	3/3			1/1	2/2	1/1		foie 1/3 conjonctive 2/3

49-53	0/5 : 0/5	5/5 : 5/5 : 1/5 : 3/5	5/5 : 5/5	foie 1/5 : Nodules lym- : phatiques 1/5:
55-57	0/3 : 0/3	3/3 : 1/3 : 3/3 : 3/3	3/3 : 3/3	
58-59	0/2 : 0/2	2/2 : 2/2 : 2/2 : 1/2	: 2/2	foie 1/2 :gingivale 1/2 rate 1/2 : gingivale 2/2:
60-61	0/2 : 1/2	2/2 : 1/1 : 2/2	2/2 : -	- : -
65-66			0/2 :	
67	- : -	1/1 : 1/1 :		
	2/56 :13/56	41/47:14/25:20/27:23/35:32/44	41/48:25/25	

b) Les éléments radiologiques (163-284)

L'étude actuelle la plus complète est celle de SPRANGER (284) qui, à partir de 12 cas, a essayé de dégager les anomalies osseuses les plus caractéristiques. Il souligne :

- leur variabilité, éventuellement à l'intérieur d'une même famille
- et la tendance à la regression avec l'âge de certaines lésions en particulier au niveau des mains et des vertèbres.
- mais l'absence de relation entre la sévérité des atteintes osseuses et la gravité clinique ou biochimique de la maladie.

L'ensemble de ces anomalies osseuses, rappelant celles de la maladie de Hurler avec une intensité bien moindre (tableau 5), est désigné sous le terme de "dysostose multiple".

Au niveau du crane, la voûte est le plus souvent épaissie et une craniosynostose pouvant toucher une ou plusieurs sutures entraîne, dans la plupart des cas, une brachycéphalie.

Au niveau du thorax, les côtes sont souvent discrètement élargies.

Au niveau du rachis, les observations relèvent dans la plupart des cas un defect antero-supérieur d'ossification d'une ou plusieurs vertèbres lombaires (en particulier L2) pouvant réaliser l'aspect classique "en éperon" et associé ou non à des vertèbres aplaties ou ovoïdes.

Au niveau du bassin, SPRANGER décrit une hypoplasie de la région basilaire avec une coxa valga signalée par divers autres auteurs (9-85-172-322-339).

Les os longs, les os des mains et des pieds peuvent présenter des troubles du modelage et de la trame avec trabéculatation grossière. Certains aspects ont pu faire évoquer le rachitisme (187).

c) Cytologie hématologique :

La présence de cellules de surcharge dans le sang périphérique et (ou) dans la moelle constitue un élément important d'orientation (49). Lorsqu'elle a été recherchée, cette anomalie a pu être mise en évidence (cf. tableau 5) sauf dans trois cas de AUTIO (6-7) et dans le cas de TSAY (305). Dans ce dernier cas, le malade était très jeune et YUNIS (339) signale que, si des cellules de surcharge n'ont pas été vues chez son malade à 6 mois, on a pu les mettre en évidence à 1 an 4 mois ; de même, dans le cas de PERELMAN (241) les lymphocytes vacuolés absents à 20 mois ont été trouvés très nombreux à 3 ans 11 mois. Dans un cas de SPRANGER (284) les cellules de surcharge n'ont été retrouvées que dans la moelle et leur apparition y serait plus précoce que dans le sang périphérique.

Dans le sang périphérique, il s'agit typiquement de lymphocytes vacuolés (de quelques % à près de 100 %) contenant 5 à 20 vacuoles de 1 à 2 microns optiquement vides au May Grunwald Giemsa mais pouvant (Yunis 339) se colorer par le PAS (qui colore les glycoprotéines et oligosaccharides) si l'on évite soigneusement l'eau lors de la fixation et de la coloration.

Dans quelques cas rares, des inclusions métachromatiques ont été vues (2-236) ainsi que des granulations dans les polynucléaires (5-158). Il a été noté (nos observations 44-45) la présence de granulations azurophiles dans certaines vacuoles des lymphocytes.

Dans la moelle osseuse, on retrouve des lymphocytes vacuolés mais aussi des histiocytes anormaux vacuolés d'aspect plus ou moins spumeux à vacuoles optiquement vides mais colorables par le PAS (YUNIS 339). AUTIO (5) signale l'existence de granules sombres dans les leucocytes.

d) Anatomo-pathologie

- Le cerveau

Il n'a été étudié que dans le cas initial d'OCKERMAN (158).

A l'autopsie, OCKERMAN signalait une substance blanche de consistance anormalement ferme, une légère augmentation de taille du système ventriculaire et un cervelet atrophique.

L'étude en microscopie optique montrait :

- . une ballonnisation généralisée du cytoplasme des cellules nerveuses celles-ci renfermaient des vacuoles contenant un matériel P.A.S. positif très soluble,
- . une perte diffuse de myéline dans la substance blanche cérébrale,
- . une perte diffuse de cellules nerveuses dans le cortex cérébral,
- . une perte de cellules de Purkinje et des neurones de la couche des grains dans le cervelet,
- . une gliose diffuse dans la substance blanche et la substance grise.

- Le foie :

Les études sont plus nombreuses et il s'agit sauf dans le cas initial d'OCKERMAN de biopsies à l'aiguille (1 biopsie chirurgicale (157)).

Microscopie optique : Dans le cas d'Ockerman (158) le stockage a été difficile à mettre en évidence du fait de la grande solubilité du matériel. Yunis (339) rapporte une architecture générale bien conservée avec seulement de petits groupes de cellules spumeuses dans les aires portales ; ces cellules et les cellules de KUPFFER se colorent modérément par le PAS si l'on évite l'emploi d'eau. KISTLER (157) signale la présence de vacuoles PAS positives dans les hépatocytes et les cellules de KUPFFER après digestion par la diastase. Ces vacuoles sont également retrouvées par LOEB (172).

Microscopie électronique : Cette étude a été réalisée dans un cas d'ORMOS (236) et NORDEN (226), dans 2 cas de AUTIO (5) dans les deux cas de LOEB (170-172) dans un des cas de ARBISSER (2) et dans le cas de PERELMAN (241) mais l'interprétation de ce dernier cas doit être faite en se rappelant que l'enfant a présenté une hépatite virale et est complètement déficitaire en alpha 1 antitrypsine.

Nous rapportons, à titre d'exemple, l'étude de LOEB (172) et LIBERT (170)

. Dans les hépatocytes, les structures cellulaires sont normales sauf le cytoplasme qui est distendu par de nombreuses vacuoles de taille variable (0,2 à 7 μ de diamètre) limitées par une membrane simple et de contenu hétérogène.

On distingue principalement une substance finement colorée par l'acide osmique uniformément dispersée comme un fin précipité protéiforme. On observe également de petits éléments lamellaires organisés en structures pseudomyeliniques, petits granules denses (0,02 à 2 μ) et des sphérules un peu plus grandes (0,03 à 0,6 μ) à centre homogène clair et limite osmophile dont l'ultra-structure est caractéristique des lipides neutres.

. les cellules de KUPFFER sont aussi dilatées par des inclusions plus petites (0,3 à 4 μ) de contenu essentiellement protéiforme avec quelques granules denses (mais pas de sphérules).

. on trouve en outre des cellules ballonisées atypiques très désorganisées.

- La biopsie conjonctivale bulbaire :

Elle a été préconisée par LIBERT (170) qui l'a étudiée dans 5 cas (2 cas de LOEB et 3 cas de FARRIAUX) et qui la considère comme très typique de la maladie.

En microscopie électronique :

. les cellules épithéliales sont normales à quelques exceptions près qui montrent des inclusions de 0,2 à 4 μ contenant un fin réticulum granuleux.

. Par contre, dans le stroma, les fibroblastes sont distendus par de nombreuses inclusions (0,2 à 5 μ) limitées par une membrane simple et qui contiennent un fin réticulum fibrillogranulaire, quelques rares images lamellaires, des agrégats denses et de petites sphérules (lipides neutres). On observe également des images de coalescence et des invaginations du cytoplasme dans les inclusions.

. les cellules endothéliales des capillaires sanguins contiennent quelques inclusions du même type.

Deux biopsies analogues ont été réalisées par ARBISSER (2) qui confirme la surcharge lysosomiale dans les fibroblastes.

- Autres études :

. L'intestin grêle (Biopsie de l'angle duodeno-jéjunal) a été étudié en microscopie électronique dans le cas de PERELMAN (241). Les anomalies observées rappellent celles d'autres maladies de surcharge lysosomiale mais l'aspect ultrastructural du contenu des vacuoles est tout à fait différent.

. 2 biopsies gingivales ont été effectuées par KISTLER (157). En microscopie optique, il observe, chez le malade présentant une hypertrophie gingivale seulement, une infiltration importante par des histiocytes vacuolés. En microscopie électronique, ces vacuoles apparaissent entourées par une membrane simple, et contiennent un fin matériel granulaire avec parfois des structures tubulaires ou pseudomyéliniques.

. dans la rate, des cellules lymphocytaires vacuolées ont été mises en évidence (157 - 158-223).

. dans les ganglions lymphatiques, KJELLMAN (158) signale la présence de lymphocytes renfermant de petites vacuoles cytoplasmiques. Sur des coupes, YUNIS (339) trouve de nombreuses cellules spumeuses.

. dans le muscle, une biopsie pratiquée par AUTIO (5) n'a mis en évidence aucune anomalie en microscopie électronique.

L'ensemble de ces études confirme la localisation lysosomiale de la surcharge dans la mannosidose ; il met en évidence le caractère essentiellement glycoprotéinique de cette surcharge et indique la présence de quelques inclusions lipidiques.

e) Mise en évidence des substances de surcharge dans la mannosidose

Accumulation Tissulaire :

Les études histologiques réalisées sur le malade d'OCKERMAN ont montré dans les cellules nerveuses ballonisées la présence de matériel PAS

positif, très soluble dans l'eau ; ces constatations jointes à l'activité faible de l'alpha D mannosidase acide dans les tissus ont conduit OCKERMAN (229-231) à rechercher une substance hydrosoluble riche en mannose. Il a pu mettre en évidence, des taux élevés de mannose dans les extraits aqueux (mais non pas dans les extraits lipidiques) de divers tissus :

. Dans l'extrait aqueux de foie de son malade, OCKERMAN (223) a noté après hydrolyse l'augmentation du mannose issu de la dégradation du matériel stocké hydrosoluble.

. ultérieurement, dans l'extrait aqueux de la substance grise du cerveau, OCKERMAN (227-228) a isolé 3 composés de poids moléculaires approximatifs 1470, 990 et 650 contenant respectivement 8, 5 et 3 résidus mannose et un résidu glucosamine en position réductrice ; dans ces composés il n'y a pas ou peu de galactosamine, pas d'hexoses (exception faite du mannose), pas d'acides aminés, ni d'acides sialiques ou uroniques. Dans le cerveau, ces oligosaccharides constituent l'essentiel des composants solubles dans l'eau, riches en mannose. Malgré l'existence probable de composés de poids moléculaire supérieur en faible quantité, (225-228), la surcharge est relativement homogène.

Dans les autres cas, les fibroblastes cutanés en culture ont constitué le principal matériel d'étude.

L'incorporation du 2^3H mannose et du ^{14}C mannose a été réalisée dans les fibroblastes humains normaux par MURAMATSU (209) ; il a montré qu'il y avait peu d'interconversion du mannose en d'autres sucres et que celui-ci était incorporé essentiellement dans des glycopeptides à séquence mannosidique dont la longueur diffère, selon que l'on utilise des fibroblastes en croissance ou à confluence.

Etudiant des fibroblastes de malade, VAMOS-HURWITZ (315) a trouvé une incorporation globale normale du ^{14}C mannose chez son malade : mais la demi-vie de la fraction d'extrait cellulaire soluble dans l'eau était de 19 jours chez le malade et de 11 jours chez les contrôles. D'autre part, ce matériel radioactif hydrosoluble était également soluble dans l'acide trichloracétique

et l'auteur a suggéré qu'il pouvait correspondre au glycopeptide isolé par TSAY (307-308).

En suivant l'incorporation du 2^3H mannose, ajouté au milieu de culture des fibroblastes cutanés d'individus sains ou atteints de mannosidose, MERSMANN (197) a montré que les fibroblastes des malades présentaient un taux de radioactivité à l'équilibre, 3 fois supérieur à celui des témoins dans la fraction de l'homogénat cellulaire soluble dans l'acide trichloracétique. Si ces fibroblastes sont mis en culture dans du milieu froid, on observe, chez le malade, une diminution plus lente de la radioactivité dans cette fraction non absorbée par le DOWEX 1 X 2. La principale différence entre les cellules normales et les cellules de mannosidose réside donc dans la décomposition plus lente de composés non précipitables par l'acide trichloracétique et non retenus par le DOWEX 1 X 2. Ces auteurs, enfin, ont montré que ce phénomène est corrigé par l'apport dans le milieu de culture d'alpha D mannosidase acide de rein de porc.

TSAY (307-308) a étudié l'incorporation du 1^{14}C mannose ajouté au milieu de culture des fibroblastes pendant 4 jours : les fibroblastes du malade incorporaient 4 à 6 fois plus de 1^{14}C mannose que les fibroblastes du contrôle (ou de malade atteint de maladie de Hurler ou d'hétérozygote pour la mannosidose) au même stade de subculture et de densité cellulaire. L'extrait aqueux de ces fibroblastes (qui contenait plus de 80 % de 1^{14}C mannose) a été passé sur colonne de concanavalline A sepharose 4B. Si, chez le malade, l'activité était partout supérieure à celle des contrôles, le matériel radioactif non lié (glycoprotéines et mucopolysaccharides) avait même composition glucidique chez le malade et le contrôle ; par contre, le matériel radioactif lié (un tiers environ du total chez le malade et le témoin) contenait des oses à un taux détectable seulement dans les fibroblastes de mannosidose. TSAY a montré que ce produit avait un poids moléculaire de 1.100 et son analyse a révélé que ce composé était un glycopeptide de structure :



contenant 3 molécules de mannose, 1 molécule de N-acétyl glucosamine, 1 molécule d'asparagine et d'autres acides aminés tels que l'acide glutamique, la glycine,

FIGURE 7

MANNOSIDOSE :

LES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES (STRECKER .1977.)

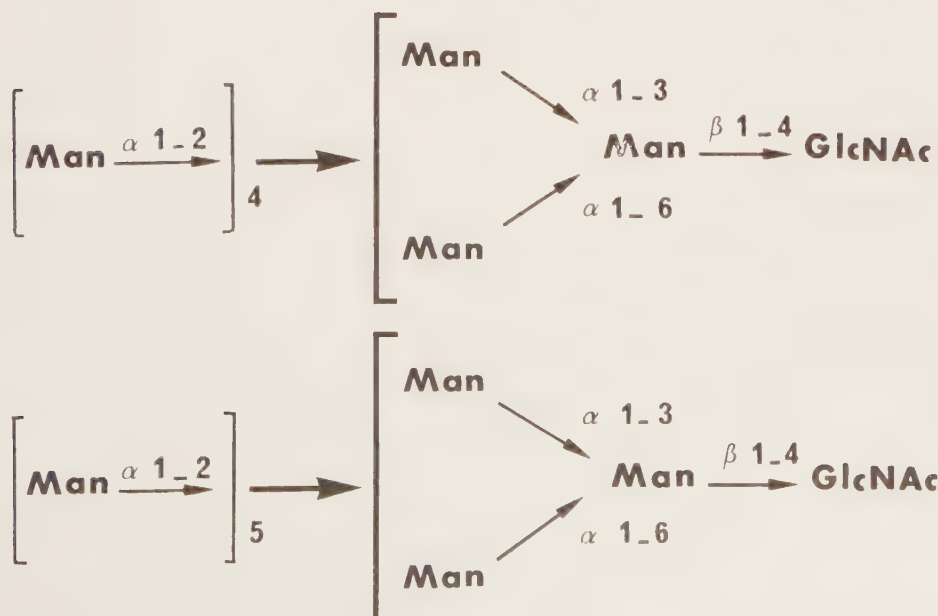
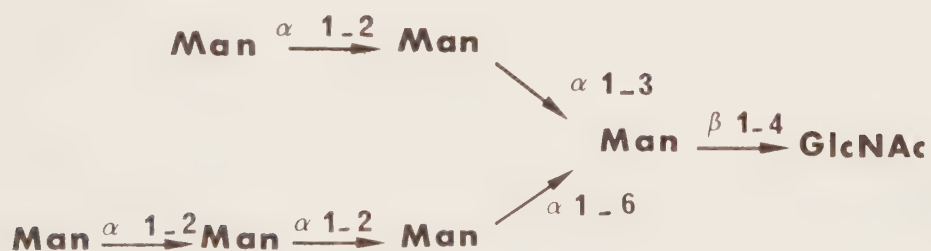
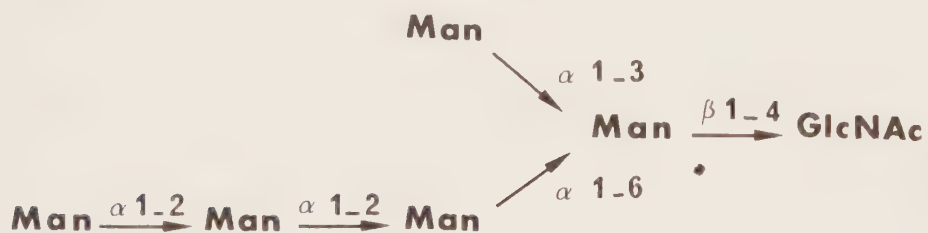


TABLEAU 6

LES CAS DE LA LITTÉRATURE - DONNEES BIOCHIMIQUES (SAUF ENZYMOLOGIE)

Cas N°	OLIGOSACCHARIDES URINES			MPS Urines	Anomalies Diverses
	Screening Humbel	Autre Détection	Etude de Structure		
1				↗ 1 fois N 2 fois	↓ IgG IgM ↓↓ IgA = 0
3 - 4		+	trisaccharide	↗	
5 - 7		+	tri - tetra- pentasaccharide	N	↓ IgG
8 - 10		+		N	
11		+	pentasaccharide	N	
12 - 13	+			N (1 répartition anormale)	
14		+		N	
19		+		N	Déficit alpha 1 antitrypsine
22 - 33				N	
34 - 38	+		7 composés différents (295)	N	
39				N	↓ Ig - fonctions polynucléaires perturbées
40 - 43				N	Ig normales
44 - 45	+			N	Ig normales
49-53	+			N	
54	+				
55 - 57	+			N	
58	Milla +			N	
59	Milla +			légèrement ↗	
60	+			↗ puis N après 15 ans	Ig:N, tests de fonction nement leucocytaire:N
61	+			limite > N	
65 - 66				N	
67	+				

Il ressort de cette étude (295) que les oligosaccharides de surcharge n'ont pas de liaison externe alpha 1,6 mannosyle ce qui laisse supposer que le déficit dans la maladie porte sur une alpha mannosidase spécifique des liaisons alpha (1 -2) et alpha (1 - 3)

f) L'anomalie enzymatique

Nous avons rassemblé les études enzymatiques de la littérature dans le tableau 7.

Anomalies de la mannosidase en dehors de la mannosidose. Des diminutions d'activité de l'alpha D mannosidase ont été rapportées :

- chez l'animal
 - . dans la maladie des "souris tremblantes " (161)
 - . chez les rats carencés en zinc (237)

- chez l'homme
 - . dans la maladie de FARBER (318)
 - . dans les leucocytes de malades atteints de leucémie lymphocytaire chronique (120)
 - . dans l'épiderme d'un malade atteint d'Erythrodermite bulleuse ichtyosiforme (183) où les auteurs suggèrent la possibilité d'un déficit en forme C ; malheureusement cette observation est mal documentée sur le plan enzymatique.

ALPHA D MANNOSIDASE DANS LA MANNOSIDOSE

(S)	=	concentration en substrat dans la réaction
MU	=	4 methylumbelliferyl alpha D mannopyranoside
P	=	paranitrophenyl alpha D mannopyranoside
F	=	foie
R	=	rate
C	=	cerveau

N = activité normale
? = non précisé

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la moyenne des témoins.

[illegible]

4	4,5	MU	9	N	(226)									4,5	MU	9	F 0%	
5	4,5 4,4	MU MU	9 0,8	N 8%	(226) (191)	4,5 4,4	MU MU	9 0,8	2,3% 7%	(5) (191)				4,5 4,75	P MU	? 9	F 43% F 44%	(5) (5)
6	4,5 4,4	MU MU	9 0,8	N 8%	(226) (191)	4,5 4,4	MU MU	9 0,8	0,7% 7%	(5) (191)	4,0	MU	1 15	6% 100%				
7	4,4	MU	0,8	8%	(191)	4,4	MU	0,8	7%	(191)				4,5	P	? ?	F 36%	(5)
8-10	4,4	MU	0,8	6-10%	(191)	4,5 4,4	MU MU	9 0,8	N.D	(6)								
11											4,0 3,8	P P	? ?	15% 5%	(305) (302)			
2-13											4,4	MU et P	? ?	5-10%	(316)			
14											3,8 4,0	P MU	? (1 15	5% 8% 100%)	(302) (13)			
5-17						4,2	MU	1	2%		4,2	MU	1	3-7%				

60-61	4,0	MU (+Zn++) 2,5 0,5 mM)	4%	4,0	MU (+Zn++) 2,5 0,5 mM)	2-3%	4,0	MU (+Zn++) 2,5 0,5 mM)	4,7%				
65-66							4,0	MU ? Km anormale: Vm conservée:	15-20%				
67							3,8	MU 1 10	2% 20%				

II.2.3. - La génétique

La fréquence de la maladie est sans doute beaucoup plus élevée que ne le laisse supposer le nombre des cas rapportés. En effet :

- cette maladie récemment décrite a été encore peu recherchée
- et nous discuterons plus loin (2e partie III.1.c.) la fiabilité de certaines méthodologies enzymatiques qui ont pu, à tort écarter le diagnostic de mannosidose (13).

Le mode de transmission autosomique récessif est corroboré par :

- l'atteinte relativement équilibrée des deux sexes : 36 garçons et 27 filles (tableau 3),
- la présence de 16 cas familiaux (2-5-10-24-71-85-91-172-181-236-284-322-339 nos cas 67-68) où les parents ont de deux à quatre enfants atteints,
- la notion de consanguinité certaine dans 7 familles sur 44,
- le fait que les parents ne sont pas atteints par la maladie et que l'on ait pu, dans certains cas, mettre en évidence chez eux une activité enzymatique intermédiaire.

Localisation chromosomique : les expériences d'hybridation cellulaire homme - souris et homme - hamster ont permis d'établir que le gène codant les formes acides lysosomiales de l'alpha D mannosidase est situé, chez l'homme, sur le chromosome 19 (40-134).

L'hétérogénéité de la maladie peut être discuté du fait :

- des variations cliniques dans son expression
- de la variabilité des activités résiduelles (tableau 7) et des anomalies structurales décrites (32) pour la protéine enzymatique
- de la possibilité de l'existence d'un déficit en alpha 1,6 mannosidase (seul le déficit des activités alpha 1,2 et alpha 1,3 ayant été mis en évidence jusqu'ici).



Le dépistage des hétérozygotes

- les oligosaccharides urinaires ont toujours été trouvés normaux.
- une activité enzymatique intermédiaire a pu être mise en évidence de façon constante pour certains cas dans le sérum et les leucocytes (nos cas 44 45 par exemple). D'autres auteurs trouvent une zone de chevauchement des activités des individus normaux et hétérozygotes (DESNICK et MILLA par exemple) ; enfin, FARRIAUX dans un de ses cas a trouvé des taux inconstants chez la mère. Une meilleure discrimination a pu être obtenue (191) par l'analyse simultanée d'une enzyme de référence : l'étude du rapport Hexosaminidase pH 4,4 sur alpha D mannosidase pH 4,4, a été concluante pour MASSON (191) et pour YUNIS (339).
- dans les fibroblastes, la discrimination des hétérozygotes est nette pour TSAY (308), pour BOOTH (24), pour ARBISSER (2) et dans nos deux premiers cas ; par contre, elle ne l'est pas dans les cas de AYLSWORTH (9) et de FARRIAUX (85).
- dans les larmes, l'étude d'une famille de FARRIAUX réalisée par VAN HOFF (85) a permis de mettre en évidence une activité intermédiaire.

Le diagnostic prénatal

La possibilité de sa réalisation avait été suggérée par divers auteurs (9-330). Nous avons démontré dans notre première famille (cas 44 - 45) qu'il était effectivement possible.

II.2.4. - Le diagnostic

a) Le diagnostic positif :

Les éléments d'orientation sont apportés par la clinique et les examens radiologiques mais ils sont insuffisants ; les anomalies oculaires, quand elles existent, et la présence de lymphocytes vacuolés dans le sang périphérique et de cellules de surcharge dans la moelle constituent une indication importante. La positivité du test de screening des oligosaccharides



urinaires (130) et l'étude en microscopie électronique de biopsie de conjonctive sont par contre très caractéristiques de la maladie.

Le diagnostic de certitude repose :

- sur la structure des oligosaccharides urinaires
- et (ou) sur l'anomalie de l'alpha D mannosidase acide dans divers tissus, cellules ou liquides biologiques (cf. tableau 7)

b) Le diagnostic différentiel

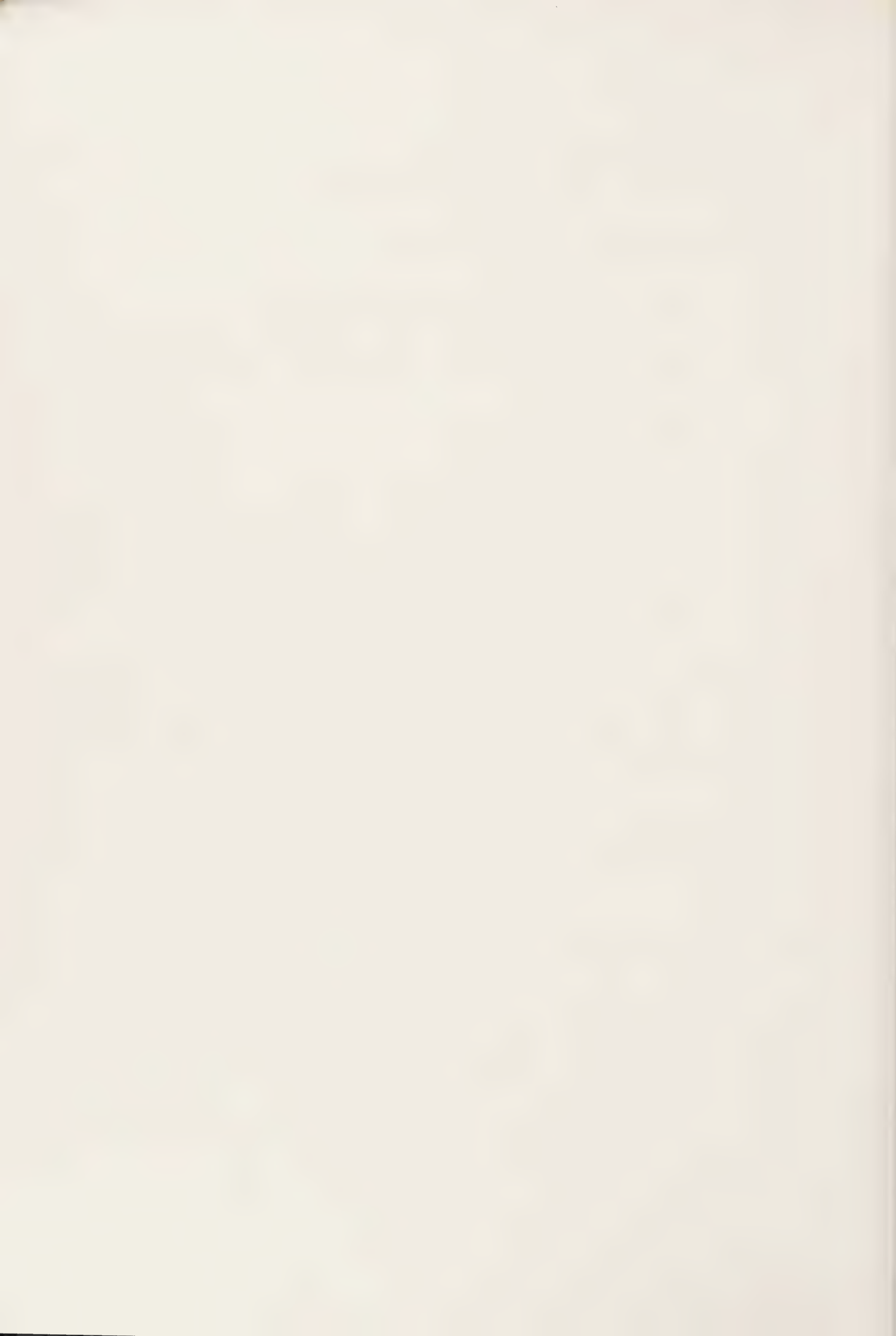
Diverses affections peuvent être discutées :

- certaines mucopolysaccharidoses en particulier la maladie de SCHIEIE ou la maladie de SAN FILIPPO (type A ou B) mais la mucopolysaccharidurie normale (ou à peine augmentée dans quelques cas) exclut le diagnostic.
- parmi les glycoprotéinoses, il conviendra d'exclure la mucolipidose de type I, la mucolipidose de type III (mais l'atteinte osseuse y est généralement plus sévère) et l'aspartylglucosaminurie mais le test de screening de HUMBEL élimine ces hypothèses.
- enfin, la confusion avec d'autres maladies de surcharge et en particulier avec les sphingolipidoses paraît moins probable.

II.2.5. - La thérapeutique

Nous n'envisagerons pas le traitement symptomatique des divers troubles occasionnés par la maladie (problèmes d'infections, problèmes auditifs et orthopédiques en particulier) et nous ne parlerons que du traitement étiologique c'est à dire la correction du déficit enzymatique.

Il faut rappeler qu'un déficit enzymatique peut théoriquement résulter (70) :



- d'une anomalie du gène régulateur conduisant à l'absence de synthèse ou à une réduction de la vitesse de synthèse ; envisagée par BEUTLER (20) mais infirmée par HAMERS (102) pour l'alpha galactosidase, cette hypothèse n'a jamais été prouvée à notre connaissance, dans un déficit humain (18).

- d'une anomalie du gène de structure conduisant à la synthèse d'une protéine anormale immunologiquement (pas de "cross reacting material") ou enzymatiquement (présence de "cross reacting material") ou les deux. Cette anomalie peut entraîner :

- . L'altération des propriétés enzymatique
- . ou une instabilité physique ou une susceptibilité plus grande aux enzymes protéolytiques de la protéine enzymatique
- . ou même les deux à la fois.

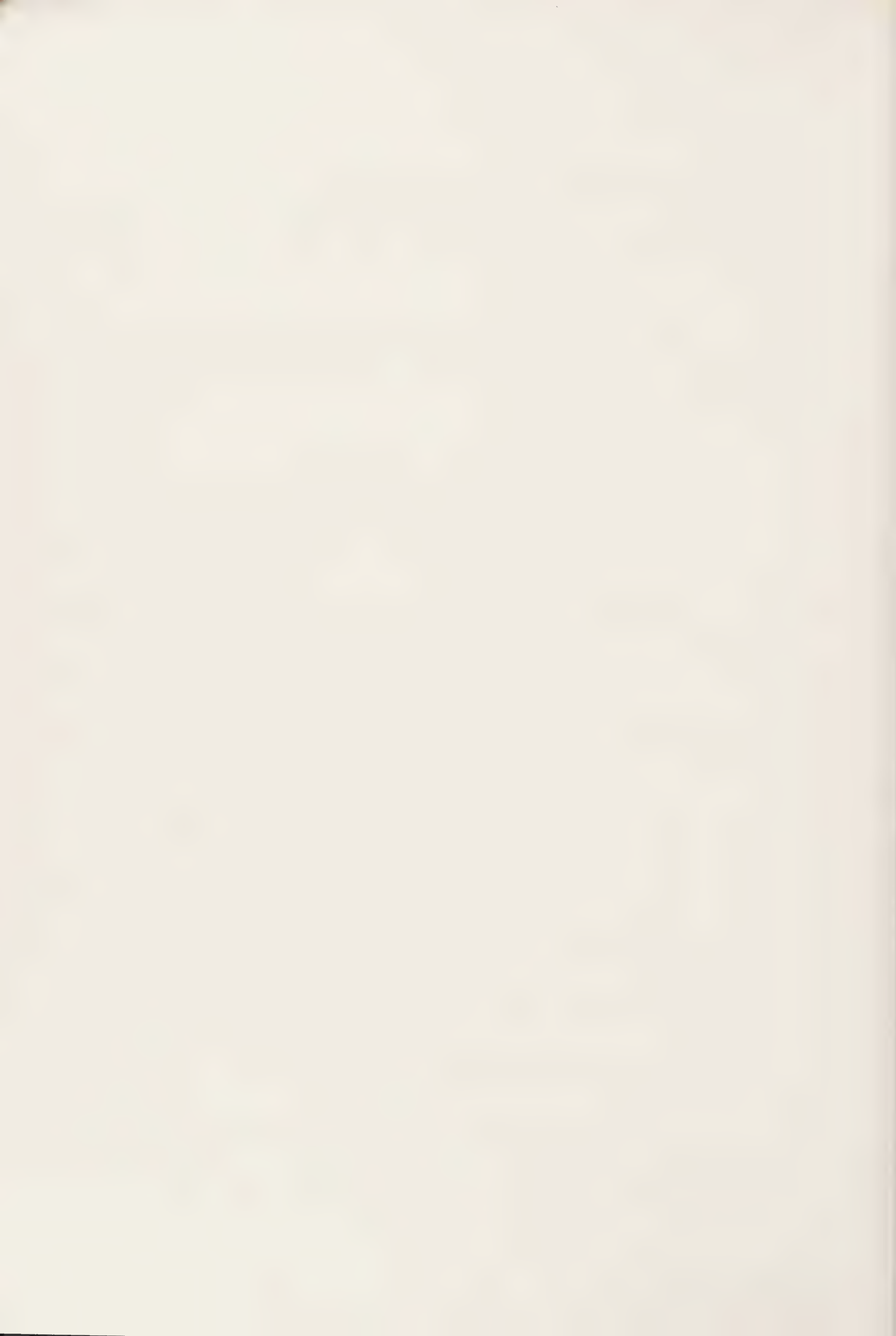
- d'anomalies post-transcriptionnelles. L'enzyme de structure normale est modifiée de façon anormale (par glycosylation, phosphorylation...) ou est mal localisée dans la cellule.

La mannosidose paraît relever du 2ème type d'anomalies et les possibilités thérapeutiques offertes sont :

- soit la stabilisation ou l'activation de l'enzyme mutante
- soit l'apport substitutif de l'enzyme normale sous forme d'enzyme purifiée ou de greffe d'organe
- soit enfin le remplacement du gène mutant par un gène normal. Nous ne ferons que citer ces manipulations génétiques qui, outre les problèmes éthiques qu'elles soulèvent, n'en sont aujourd'hui, en ce qui concerne les mammifères, qu'au stade de la spéculation intellectuelle (292).

a) Stimulation, stabilisation de l'enzyme mutante

Elle constitue la solution la plus favorable (267). Elle doit se situer le plus tôt possible dans la vie de l'enfant, c'est à dire en période néo-natale ou même, in utero, puisque l'on a pu montrer dans certains cas que



l'atteinte existait au stade foetal (104-249-332).

Dans le cadre des maladies de surcharge lysosomiale, la prednisolone a permis de stimuler la phosphatase acide de sujet déficitaire (212) et dans la maladie de KRABBE(254) une petite molécule synthétique augmenterait l'activité de la cerebroside Beta galactosidase anormale. (254).

Dans la mannosidose, PATEL (237) à la suite de ses travaux sur les rats carencés en zinc, a proposé d'essayer de stimuler l'activité résiduelle de l'enzyme par ce cation. Chez l'homme, le rôle d'un déficit en zinc dans la genèse de la maladie (3) a été écarté et un essai de thérapeutique par le zinc (173) par voie générale et locale (pour faire regresser l'hypertrophie gingivale) s'est soldé par un échec malgré une augmentation notable du taux sérique de zinc.

b) La thérapeutique substitutive

Elle apporte l'enzyme normale soit directement soit par greffe d'organes.

Le principe de ce type de thérapeutique repose sur la possibilité de l'appareil lysosomal de capter activement l'enzyme du milieu extracellulaire par endocytose.

Deux modèles ont permis l'étude de cette thérapeutique :

- in vitro : les cultures de fibroblastes de malades atteints du déficit à corriger. Ce modèle a été largement étudié par MERSMANN dans le cas de la mannosidose (197-198-200-201-313-326),

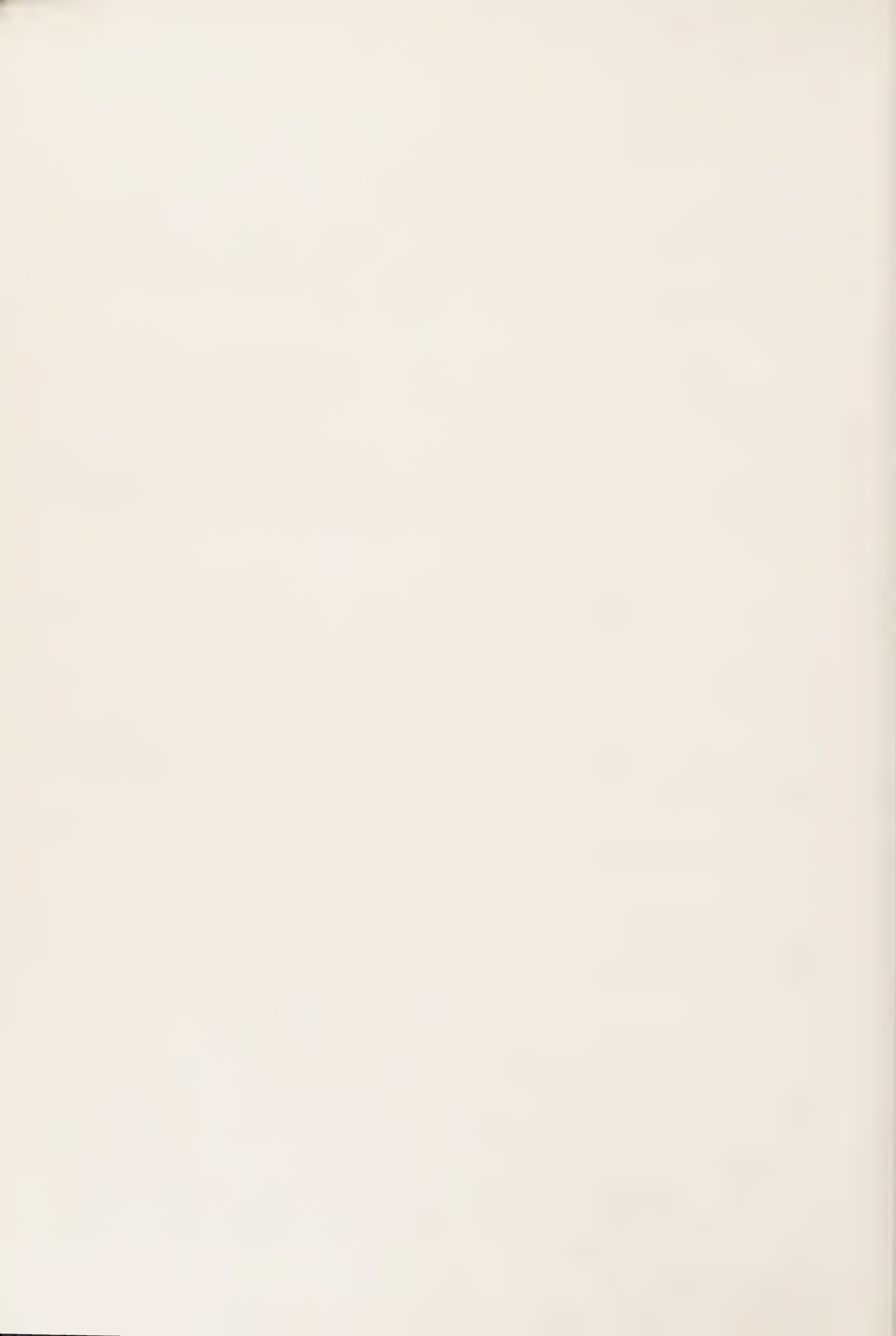
- in vivo :

Les animaux déficitaires

. artificiellement : rats carencés en zinc (237)

. ou mieux naturellement : le veau Angus réalise le tableau animal de la mannosidose (113-136-138)

Les animaux non déficitaires permettent eux de suivre le devenir de l'alpha-mannosidase marquée à l'iode radioactif dans l'organisme de l'animal (186)



L'enzyme peut être apportée sous forme non purifiée, purifiée ou de greffe d'organe.

- Apport d'une enzyme non purifiée :

Des essais de correction des mucopolysaccharidoses par transfusion de plasma humain normal ont été entrepris après les travaux de HORS CAYLA (115) sur les fibroblastes en culture. D'autres sources enzymatiques que le plasma ont été essayés (74-184) en particulier les leucocytes (159) mais les résultats étaient discutables (75 Discussion).

Dans la mannosidose, un essai de correction par perfusion intraveineuse d'un concentré leucocytaire (73) s'est soldé par un échec et aucune augmentation consécutive de la mannosidase acide n'a pu être mise en évidence.

- Apport d'enzyme purifiée

§ La quantité à administrer va dépendre

. de l'efficacité de la captation de l'enzyme par la cellule :
elle dépend à la fois de la source tissulaire de l'enzyme utilisée, de ses isoenzymes, de son mode de préparation (215- 287-313-326) et des récepteurs de la cellule cible (201). L'alpha mannosidase de porc de forme B2 (pI le plus bas) n'est reconnue par les fibroblastes que pour une faible partie de son activité (313) ; quant à la forme A endocytée très lentement, cette endocytose supposée jusqu'alors passive est inhibée par le mannose-6-phosphate (313).

. de l'efficacité de l'enzyme endocytée vis à vis de la dégradation du substrat : en effet , pour une même activité in vitro sur le substrat synthétique , la correction dans les fibroblastes va dépendre de l'origine de l'enzyme.

Ces deux phénomènes sont explicités par MERSMANN (200) dans le tableau 8)



TABLEAU 8

TAUX D'ALPHA MANNOSIDASE EXTRA ET INTRACELLULAIRE DE
DIVERSES SOURCES NECESSAIRE A LA DIMINUTION DE 50 %
DES SUBSTANCES DE SURCHARGE
(MERSMANN 1978 (200))

: Source de l'enzyme	: Alpha mannosidase	: alpha mannosidase	:
:	: extracellulaire mu/ml	: intracellulaire mu/mg	:
:	:	: de protéine	:
:	:	:	:
: Rein de porc	: 20	: 3,3	:
:	:	:	:
: Foie de Boeuf	: 334	: 4,2	:
:	:	:	:
: Placenta humain	: 44	: 6,7	:
:	:	:	:
: urine humaine	: 605	: 4,8	:
:	:	:	:
: Fève Jack	: 1573	: 11,4	:
:(canevalia ensiformis)	:	:	:
:	:	:	:

Il ressort de cette étude qu'il faut 80 fois plus d'alpha mannosidase de Fève Jack que de rein de porc dans le milieu de culture pour aboutir à la même efficacité corrective et que l'activité intracellulaire nécessaire à l'obtention de la demi-correction maximale varie de 1 à 3,5.

Les dernières études de MERSMANN (201) visent à obtenir une enzyme uniquement sous forme hautement endocytée par les fibroblastes : la présence d'un glucide phosphorylé serait nécessaire.

§ La quantité d'enzyme à administrer dépend également

- . de la stabilité de l'enzyme avant d'atteindre sa cellule cible
- . et de la stabilité de l'enzyme dans le lysosome lui-même



§ Les problèmes à résoudre pour l'instauration d'une telle thérapeutique sont extrêmement nombreux (256)

. Une enzyme pure et activement captée doit être obtenue en quantité suffisante. Les sources les plus abondantes d'enzymes humaines sont l'urine et le placenta, encore faut-il que ces enzymes aient une endocytose active ; toutefois, il semble possible d'envisager, sans altérer l'activité catalytique, de modifier les sites glucidiques responsables de la reconnaissance ou de fixer à l'enzyme des "étiquettes" (335).

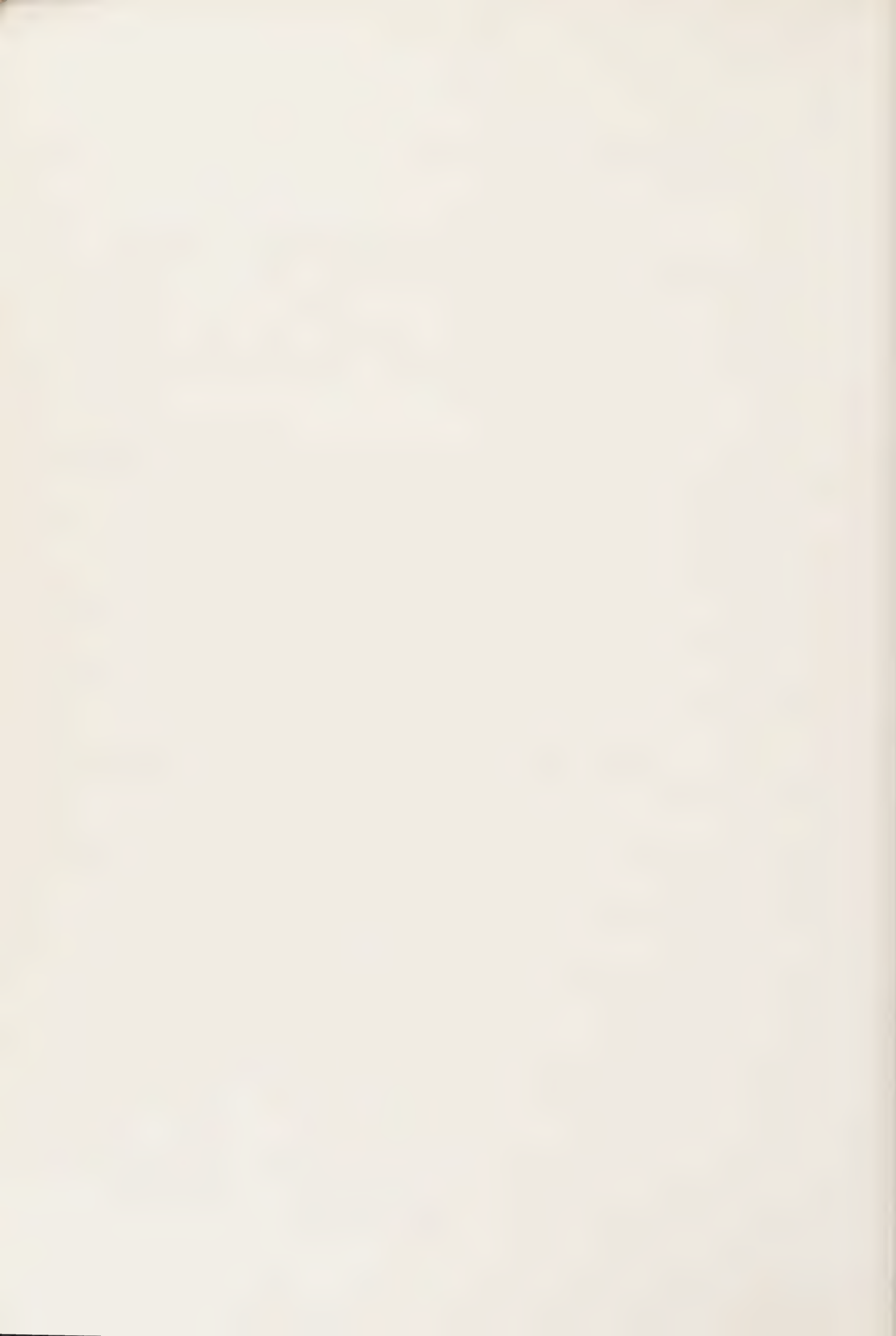
. L'administration de l'enzyme ne doit pas amener de complications immunologiques : en effet l'emploi d'enzymes humaines ne garantit pas l'absence de tels accidents. Si la protéine enzymatique manque ou ne présente pas ses sites immunologiques (absence de "cross-reacting material") l'enzyme même humaine risque d'être antigénique (83) ; de plus même en présence de "cross reacting material", l'existence éventuelle d'un polymorphisme d'un individu à l'autre n'est pas exclue. La présence néanmoins favorable de "cross reacting material" a été démontrée par MERSMANN (198) chez les mutants atteints de mannosidose. Il a également mis en évidence des réactions croisées entre les mannosidases d'origines humaines et animales (199).

. enfin l'enzyme doit arriver au contact de son substrat et y être active. Pour cela elle doit :

atteindre l'organe cible ce qui est assez facile pour les cellules à endocytose active comme le foie ou la rate (265) mais beaucoup plus difficile pour les autres organes et il faut alors envisager de modifier les sites de reconnaissance de l'enzyme.

traverser diverses barrières comme la barrière hémato-méningée dont l'ouverture ne peut actuellement être obtenue sans dommages. Jusqu'ici les enzymes injectées n'ont jamais pu, à notre connaissance, atteindre le système nerveux central (68 Discussion - 98-237) et la mannosidase radioactive injectée au rat par MARINKOVIC (186) n'atteignait un taux notable que dans le foie.

enfin, atteindre l'appareil lysosomal des cellules cibles où le substrat s'est accumulé (265). Malheureusement, les vacuoles surchargées fusionnent moins bien et l'enzyme y semble moins active.



L'ensemble de ces problèmes rend beaucoup d'auteurs plus pessimistes, sauf dans le cas de maladie n'atteignant pas notablement le système nerveux central et évoluant lentement (forme adulte de la maladie de GAUCHER ou maladie de FABRY).

§ Pour résoudre ces problèmes (stabilité de l'enzyme, problèmes immunologiques, atteinte de la cellule cible), diverses améliorations ont été proposées :

Il est possible d'augmenter la stabilité des enzymes par des modifications chimiques n'altérant pas leur activité catalytique (335), d'améliorer leur captation par l'organe à l'aide de modification du site de reconnaissance ou par fixation à une "étiquette" (glycoprotéines désialylées ou immunoglobulines anticorps de surfaces cellulaires données) (99).

Pour améliorer la tolérance immunitaire et stabiliser l'enzyme, il est possible de les enrober :

. soit dans les erythrocytes du malade lui même (54-61-304) : "l'étiquettage" peut alors être modulé par divers procédés (21-61),

. soit dans les liposomes (99) : ceux-ci permettent d'envisager l'emploi d'enzyme d'origine non humaine et le traitement de malades ne présentant pas de "cross-reacting material". Pour diriger plus précisément ces liposomes vers leurs cellules cibles, diverses possibilités existent :

- la charge de la surface peut être modifiée (99-289-290)
- diverses "étiquettes" peuvent être fixées à la surface des liposomes (46-99-328).

faut noter l'intérêt tout particulier du glutaraldehyde qui permet de stabiliser l'enzyme in vitro et in vivo (par réalisation de ponts entre les chaines) et de fixer sur son groupement libre les "étiquettes" du liposome(99-335).

- Apport de l'enzyme par une greffe

Dans son principe (69) le tissu greffé continue à produire l'enzyme normale. Celle-ci peut agir selon les cas :

. en métabolisant in situ le substrat si celui-ci s'accumule dans le plasma ; il est même possible de supposer qu'un gradient de concentration



s'établit alors entre le substrat accumulé dans le tissu et le plasma épuré favorisant la résorption de la surcharge ; les greffes de foie, rate et rein sont supposées fonctionner sur ce modèle essentiellement.

. ou en étant distribuée par la circulation (du fait du turn-over des cellules du greffon ou d'une sécrétion par ces cellules) à d'autres tissus où s'est accumulé le substrat ; les greffes de moelle osseuse, pancréas et thymus doivent procéder de ce type de mécanisme.

Ces faits et la connaissance de l'étiopathogénie de la maladie déterminent le choix du greffon.

La revue des divers essais réalisés dans ce domaine est longue (17-69) et de nouvelles expériences sont sans cesse publiées. La maladie de Fabry constitue le prototype de ces essais thérapeutiques ; en effet, comme pour les enzymes purifiées, les greffes ont toujours été décevantes en cas d'atteinte du système nerveux central.

Dans la mannosidose, aucun essai de thérapeutique enzymatique par greffe d'organes n'a été rapporté jusqu'ici chez l'homme. Néanmoins la mise en évidence d'une chimère chez un veau Angus atteint de mannosidose a réalisé un excellent modèle expérimental de ce type de thérapeutique (141) : ce veau avait reçu de son jumeau sain un transplant de lymphocytes au cours du développement foetal. L'augmentation d'activité enzymatique chez le veau atteint n'a été sensible qu'au niveau des lymphocytes et des ganglions lymphatiques. Toutefois, si une diminution de la quantité d'oligosaccharides a pu être constatée au niveau du cerveau, des ganglions lymphatiques et du foie par rapport à des veaux témoins atteints de mannosidose, le transplant n'a pas modifié l'évolution vers la détérioration neurologique rapide du veau chimérique.

Malgré les espoirs suscités par la thérapeutique enzymatique, il reste beaucoup de problèmes à résoudre dans ce domaine ; et, actuellement, seul le traitement prophylactique basé sur le dépistage prénatal peut être effectivement proposé aux familles à risque.



II.2.6. - La mannosidose animale :

La mannosidose du veau Angus constitue le modèle animal de la maladie humaine.

a) clinique :

La maladie a été décrite en 1957 par WHITEM (329). Elle est caractérisée par une ataxie, une incoordination motrice, des tremblements de la tête et un tremblement d'intention, le développement d'une tendance à l'agressivité, une stagnation staturo-pondérale et la mort survient généralement dans la première année de la vie (138).

b) étude anatomo-pathologique :

En microscopie optique, les vacuoles optiquement vides ont été décrites dans les macrophages des ganglions lymphatiques, les cellules exocrines du pancréas et les neurones (136-143-329).

En microscopie électronique, ces vacuoles limitées par une membrane simple sont vides à l'exception de fragments membranueux et occasionnellement de matériel amorphe dense aux électrons.

c) la surcharge

Tissulaire

Il a été possible d'extraire des ganglions lymphatiques et du cerveau des animaux atteints un oligosaccharide contenant du mannose et de la glucosamine (113-242) et NORDEN (219) propose pour ces oligosaccharides cérébraux des structures du type



Urinaire

LUNDBLAD (179) montre que le principal oligosaccharide augmenté dans la mannosidose bovine est un pentasaccharide de structure





On remarque tout particulièrement la présence de liaison α -1,6 à l'extrémité non réductrice terminale qui n'a jamais été notée dans la mannosidose humaine. Cette différence provient soit de l'enzyme, soit de son substrat glycoprotéinique.

d) l'anomalie enzymatique

Dans le plasma (334)

L'activité de l'enzyme chez le veau normal (très proche de l'enzyme humaine) présente un pH optimal de 4 - 4,3, une K_m pour le dérivé de la 4-méthylumbelliférone de 0,60 à 0,69 mM ; elle est stimulée par le zinc Zn^{++} qui diminue le pH optimal, inhibée par l'EDTA et le cobalt et stable 1 heure à 55° C.

Chez le veau atteint de mannosidose, l'enzyme présente un pH optimal de 5,5, une K_m à ce pH de 2,73 à 5,45 mM ; le zinc a un effet similaire mais l'EDTA est sans effet et le cobalt fait apparaître 2 pics de pH 5,25 et 5,75. Cette activité est inhibée en 20 minutes à 55° C et révèle des formes multiples par focalisation électrique.

Il ne semble pas y avoir, de corrélation entre les activités acides et intermédiaires.

L'activité α mannosidase acide normale du plasma, varie avec les individus, la saison, l'âge et le sexe (137-139) mais les hétérozygotes présentent toujours une activité de moins de 50 % ce qui a permis d'envisager la réalisation d'un programme de détection des hétérozygotes (138-139).

Dans les tissus malades la forme acide de l'enzyme est presque totalement absente du cerveau, du foie (113). Dans le foie, PHILIPPS (242) sépare 3 isoenzymes A, B et C par chromatographie sur DEAE cellulose et montre que ce sont, comme chez l'homme, les formes acides A et B qui sont déficitaires (activité inférieure à 10 %).

PHILIPPS (247) a montré que l' α mannosidase résiduelle du boeuf atteint de mannosidose donne une réaction croisée avec les anticorps anti- α -mannosidase normale de boeuf ; d'autre part la concentration de "cross reacting



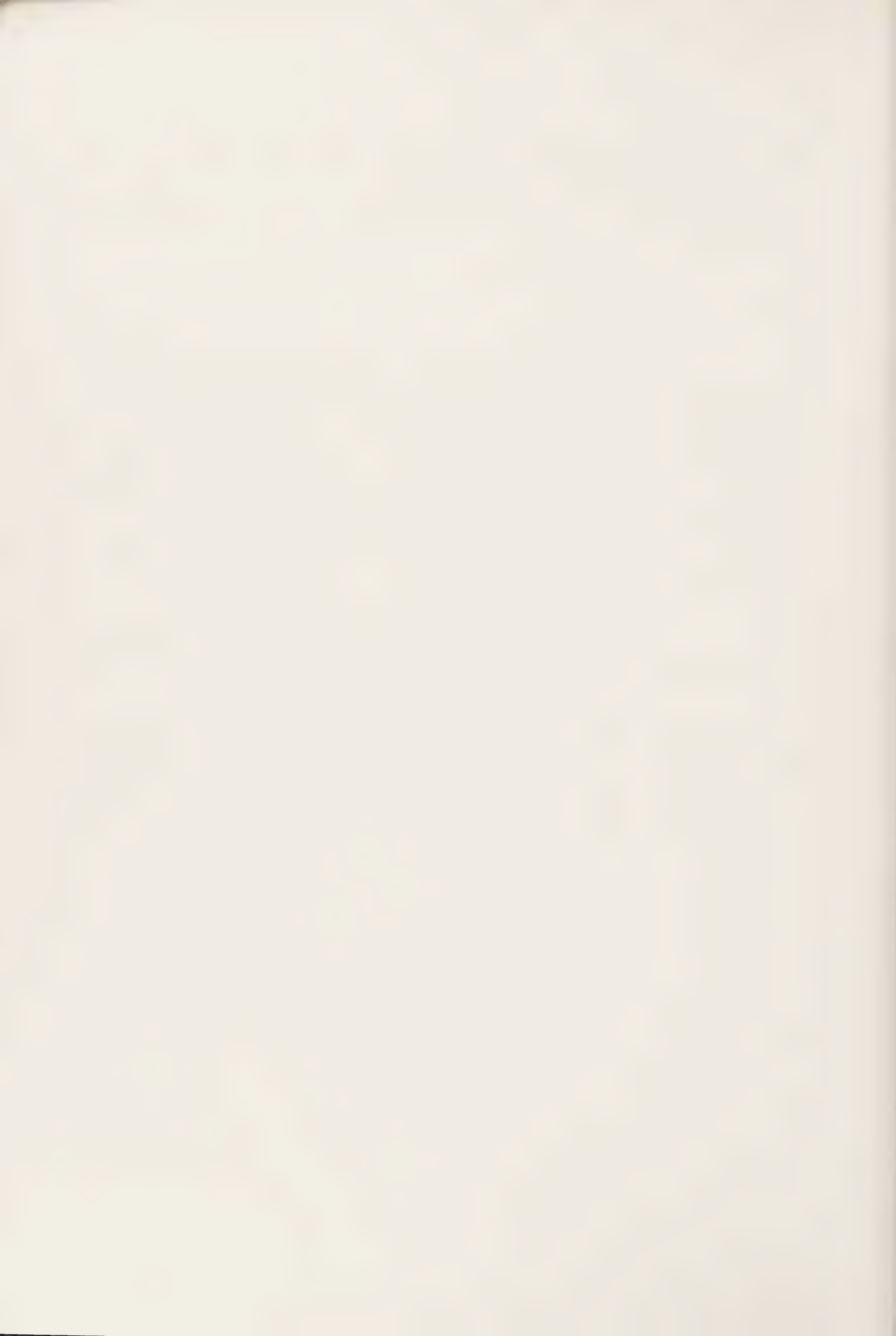
material" semble proportionnelle à l'activité enzymatique résiduelle ce qui implique soit une anomalie du gène régulateur, soit une anomalie du gène structural entraînant à la fois la diminution des propriétés enzymatiques et antigéniques.

e) généétique

La fréquence du gène pour la mannosidose chez le veau Angus est telle (supérieure à 0,05) qu'un programme systématique de détection des hétérozygotes a été instauré en Nouvelle Zélande dans le noyau de troupeau de veau Angus à pédigré (140-303). Le programme initial a porté sur plus de 8.000 bovins à l'aide de plasma (140) par une méthode automatisée. Divers milieux biologiques (plasma, leucocytes, lymphocytes), et diverses techniques statistiques et divers modes d'expression des résultats (en fonction du volume, du taux de protéine, d'une ou plusieurs enzymes de référence) ont ainsi pu être testés (142-303).

Enfin les études épidémiologiques et génétiques sur la descendance des sujets hétérozygotes ont confirmé la transmission autosomique récessive.

Le veau Angus est donc apparu comme un modèle animal extrêmement précieux en dépit de différences cliniques et biochimiques non négligeables avec la maladie humaine. Il a constitué un modèle irremplacable pour l'étude d'un programme de dépistage des hétérozygotes et pour les essais de thérapeutique enzymatique de la mannosidose (141).



DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE ACIDE
CHEZ DES SUJETS SAINS OU ATTEINTS DE MANNOSIDOSE
APPLICATION AU DIAGNOSTIC PRENATAL



I - MATERIEL D'ETUDES ET METHODES

I.1. - LES MALADES

Les observations des malades qui font l'objet de ce travail ont été rapportées (Première partie II.2.1.).

I.2. - MATERIEL BIOLOGIQUE

Les urines sont prélevées sur quelques gouttes de chloroforme pour éviter la pousse microbienne. Nous avons réalisé le screening des oligosaccharides sur une miction du matin. L'emploi d'un échantillon de diurèse reste néanmoins préférable.

Le sérum. Un échantillon de sang prélevé sur un microtube sec type BECKMAN (0,5 ml) suffit à réaliser une mesure d'activité enzymatique à plusieurs pH.

Le sérum est séparé le plus rapidement possible (à température du laboratoire) et utilisé immédiatement ou congelé à -80°C dans notre expérience (une congélation à -20°C est néanmoins suffisante).

Les leucocytes. Les leucocytes, provenant de 5 à 10 ml de sang veineux recueilli sur anticoagulant, (héparinate de lithium ou "anticlot"), sont isolés par décantation à l'aide d'une solution contenant 5 % de polivinyl pyrrolidone et 2,5 % de citrate de sodium. Un volume de cette solution est mélangé par retournement à 4 volumes de sang. Le tube incliné à 45° est placé au bain-marie à 37°C 30 minutes environ. les couches supérieures (plasma, leucocytes, plaquettes et la partie supérieure du culot érythrocytaire) sont recueillis à la pipette pasteur puis centrifugés à faible vitesse (500 - 600 g), 10 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$. Les globules rouges restant dans le culot sont lysés par choc hypotonique à froid par agitation mécanique rapide à l'aide de 3 ml d'eau distillée ; l'isotonicité est restaurée après 30 secondes exactement par addition de 1 ml d'une solution de chlorure de sodium à 3,6 %. Le mélange est



centrifugé à faible vitesse (500 g), 5 minutes à + 4° C et l'opération de lavage est répétée jusqu'à obtention d'un culot leucocytaire exempt de globules rouges.

Le culot leucocytaire obtenu est stocké tel quel au congélateur à -80° C s'il n'est pas immédiatement analysé ou, repris dans 200 à 600 micro-litres de sérum physiologique stérile et la suspension est lysée par les ultra-sons (3 fois 10 secondes à 8 kilocycles).

La conservation à -80° C du culot sec ou même de l'homogénat est excellente (plusieurs mois).

Les fibroblastes cutanés. Ils sont obtenus après mise en culture d'un petit fragment cutané (quelques mg) prélevé stérilement sans anesthésie.

Le prélèvement est découpé en fragments qui sont répartis en plusieurs boîtes de Pétri stériles (type falcon) de 35 mm de diamètre, fixés à l'aide de lamelles de verre et recouverts de milieu de culture.

Les boîtes sont placées dans un incubateur à température constante (36,8° C) sous atmosphère humide à 100 % et contenant 5 % de gaz carbonique.

Le milieu de culture est du milieu de HAM F 10 enrichi de 15 % de sérum de veau foetal (sauf dans les expériences où nous avons étudié la sécrétion de l'enzyme dans le milieu de culture) et supplémenté en pénicilline, streptomycine et fungizone.

Les fibroblastes sont récoltés par trypsination des cellules à confluence à partir du stade de la 4ème subculture.

Les cellules sont centrifugées à faible vitesse et lavées 3 fois à l'aide de sérum physiologique stérile dans lequel elles sont finalement mises en suspension avant d'être lysées par les ultrasons (3 fois 10 secondes à 8 Kilocycles).



Le milieu de culture des fibroblastes. Lorsque l'étude de l'enzyme est pratiquée sur le milieu de culture des fibroblastes, ceux-ci, à partir du stade de la 4ème subculture ou au delà, sont cultivés sans sérum de veau foetal ; en effet, la thermostabilité de l'alpha D mannosidase acide présente dans le sérum de veau ne permet pas sa destruction par la température sans endommager considérablement le sérum de veau qui risque de devenir toxique pour les cellules.

Pour ce faire, lors d'un changement de milieu, un lavage des cellules par du milieu sans sérum est effectué (quelques heures de contact) puis la culture est poursuivie avec ce même milieu pendant 2 à 4 jours. Celui-ci est alors prélevé puis concentré (de 20 à 50 fois) sur membrane DIAFLO X M 50 pour les études de l'alpha mannosidase.

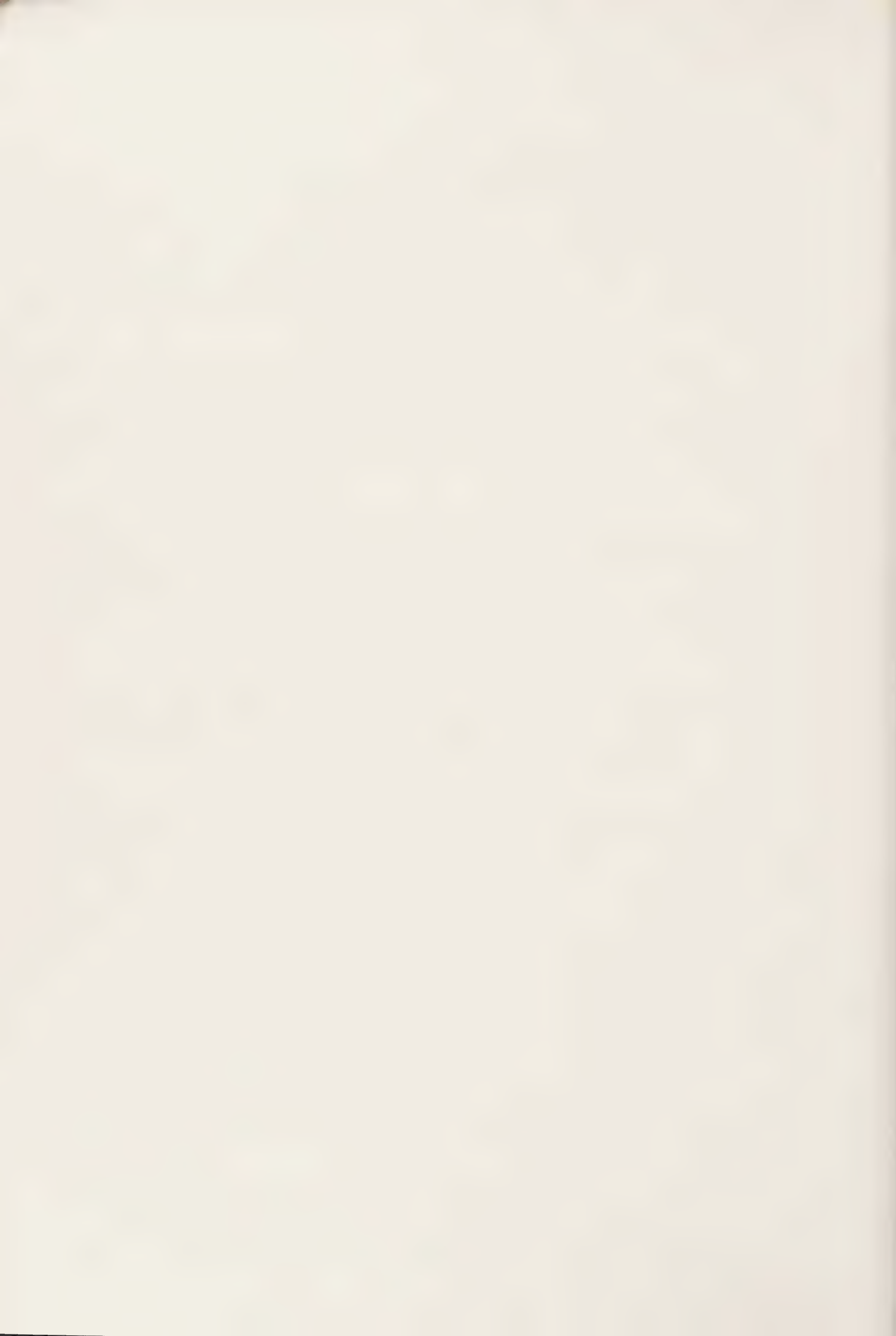
Les cellules et le liquide amniotiques : Ils sont obtenus par amniocentèse transabdominale pratiquée vers la 15e - 16e semaine d'aménorrhée. Le prélèvement est aussitôt centrifugé à faible vitesse (500 g) pendant 10 minutes à la température du laboratoire et séparé en :

- liquide exempt de cellules
- et culot de cellules amniotiques qui sont numérotées puis mises en culture (environ 40.000 cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre).

Différents types cellulaires existent normalement et en proportions variables dans le liquide amniotique : les plus fréquents sont fibroblastiques et épithélioïdes. La connaissance de ces faits est importante pour suivre l'évolution de leur culture et ultérieurement pour l'interprétation des résultats des analyses enzymatiques : leur contenu enzymatique peut en effet varier quantitativement et (ou) qualitativement ; ce sont les fibroblastes qui constituent le matériel d'étude des enzymes lysosomiales et de l'alpha D mannosidase en particulier.

Les conditions de culture des cellules amniotiques sont sensiblement les mêmes que pour les fibroblastes ; la seule différence est l'enrichissement plus important du milieu en sérum de veau foetal (20 % au lieu de 15 %).

D'autre part, étant donnés les impératifs diagnostiques, (obtention des résultats dans un délai maximum de 3 à 4 semaines), les cellules sont étudiées dès le stade de la culture primaire ; les déterminations d'activité.



sont effectuées parallèlement sur des cellules amniotiques de référence, traitées dans les mêmes conditions et sur les fibroblastes cutanées du cas index familial conservés en banque cellulaire.

Les cellules amniotiques, après récolte, sont traitées comme les fibroblastes cutanés.

Les prélèvements d'autopsie (foie témoin, foetus étudié après avortement thérapeutique) prélevés quelques heures après la mort, sont immédiatement enveloppés dans du papier type parafilm et congelés à -80° C. Ils sont étudiés sous forme d'homogénat au 1/10e (P/V) dans l'eau bidistillée ; ces homogénats sont réalisés à l'aide d'un homogénéiseur de Potter-Eveljhem sauf pour les quantités importantes de tissus : dans ce cas, la méthode utilisée sera rapportée à propos de la semi-purification du foie foetal (deuxième partie II.8)).

Les placentas. Les placentas ayant servi à la purification de l'enzyme nous ont été fournis gracieusement par le Docteur LIAUTAUD (Institut MERIEUX - 69 - Marcy l'Etoile).

Ces placentas n'ont subi aucun traitement et ont été conservés congelés dès leur obtention dans les diverses maternités. Ils ont été étudiés sous forme d'homogénats ou à des degrés divers de purification comme nous le décrivons (deuxième partie II.7.).

I.3. - METHODES

I.3.1. - Etude des oligosaccharides dans l'urine par la technique de screening de HUMBEL (130)

La méthode décrite par HUMBEL consiste à déposer 20 microlitres de l'échantillon d'urine sur une plaque de silicagel (20 x 20 cm Merck ref : 5715), parallèlement à une solution étalon contenant 10 microgrammes de lactose.

Après un séchage soigneux du dépôt, la chromatographie est développée une nuit dans le mélange n-butanol-acide acétique-eau (100 / 50 : 50 v/v) fraîchement préparé.

La plaque est séchée puis vaporisée avec une solution extemporanée d'orcinol à 0,2 g dans 100 ml d'acide sulfurique dilué (20 g pour 100 ml) et chauffée 10 mn à 100 ° C.

I.3.2. - Détermination de l'activité enzymatique de l'alpha-D mannosidase

- Principe :

En milieu tamponné à pH acide l'alpha D mannosidase hydrolyse le 4 methylumbelliferyl alpha D mannopyranoside.

La réaction est arrêtée après incubation par addition de tampon alcalin.

La fluorescence développée en milieu alcalin par la methylumbelliférone libérée est mesurée comparativement à une gamme étalon de 4 methylumbelliférone.



- Réactifs :

. 4 methylumbelliféryl alpha D mannopyranoside : laboratoires Koch Light

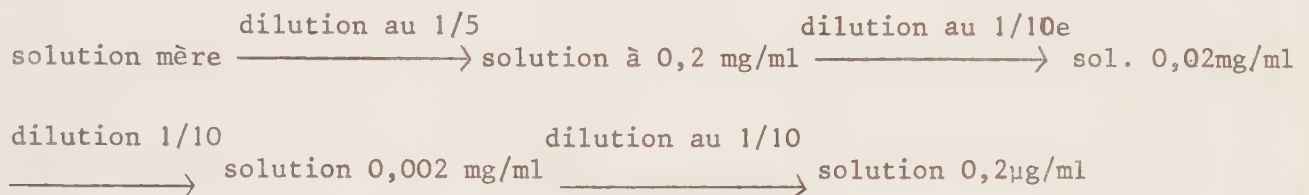
. tampon citrate - phosphate au pH indiqué : obtenu par mélange d'une solution d'acide citrique 0,1 M et de phosphate disodique 0,2 M (dont le

choix résulte de la figure 8).

- . tampon bicarbonate - carbonate de sodium 0,5 M pH 10,4 - 10,7
- . 4 methylumbelliférone (Serlabo)

La gamme d'étalonnage est obtenue à partir d'une solution mère à 1 mg/ml dans le tampon bicarbonate - carbonate (conservation 1 semaine à +4° C à l'abri de la lumière).

Les dilutions successives de la solution mère sont également préparées dans le tampon bicarbonate - carbonate selon le schéma suivant :



La linéarité étant toujours respectée dans cette zone, on se contente le plus souvent de mesurer la fluorescence correspondant à la solution à 0,02 mg/ml.

- Mode opératoire :

- . sur les cellules et les homogénats :

1ere méthode

Une solution aqueuse de substrat est préparée de telle sorte que la concentration en substrat dans le mélange réactionnel soit égale à 7,8 mM.

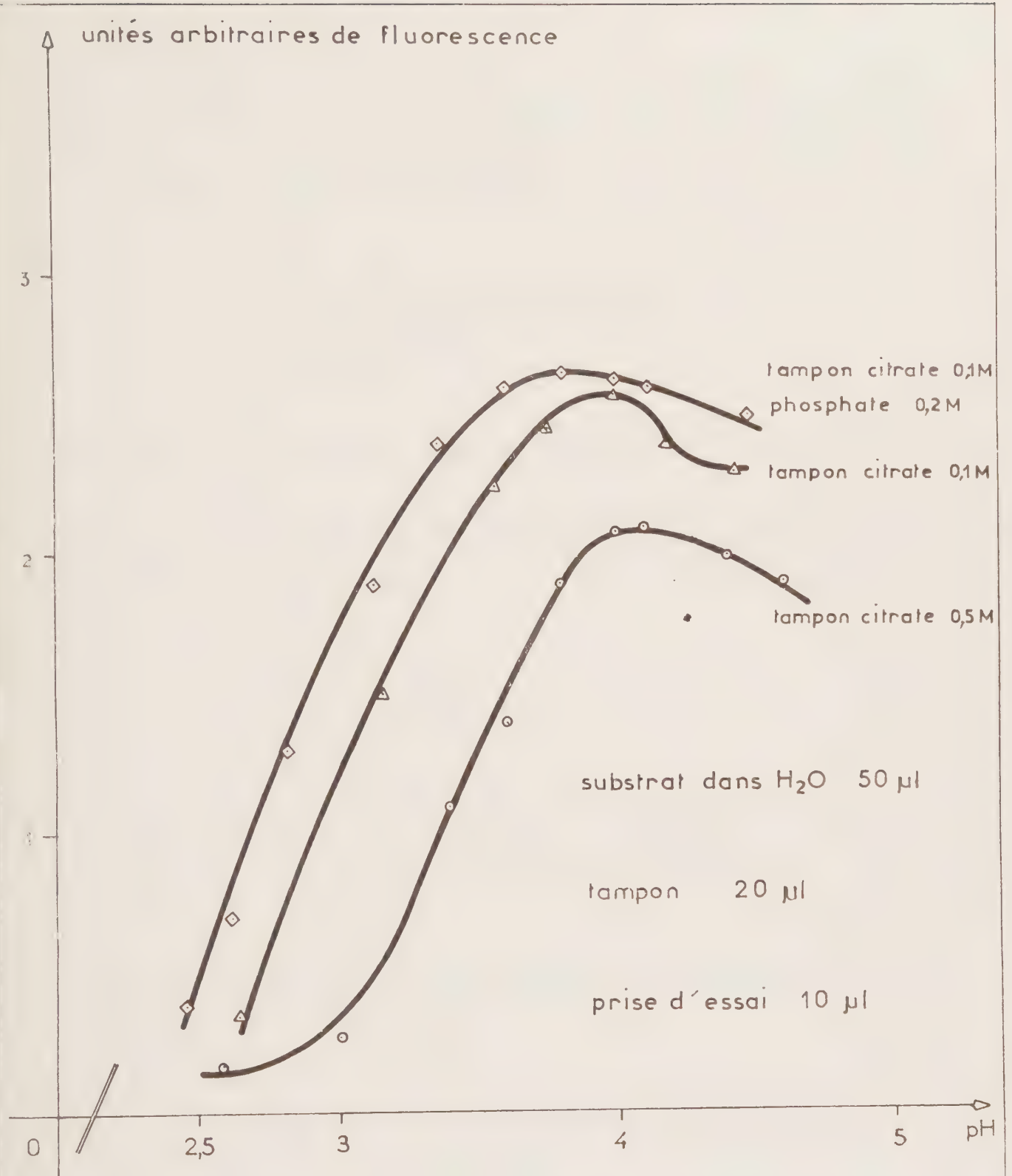
Solution aqueuse de substrat = 50 µl

Tampon citrate phosphate pH 3,8 ou pH 5,2 : 20 µl

Prise d'essai de l'échantillon : 10 µl

Le mélange réactionnel est incubé 0, 10 et 20 minutes à 37 ° C et la réaction est arrêtée par 1,5 ml de tampon bicarbonate - carbonate.

FIGURE 8



CHOIX DU TAMPON POUR L'ETUDE DE

L α D MANNOSIDASE ACIDE

fibroblastes en sub. 7

2eme méthode

Au lieu de réaliser 2 essais à 2 pH différents, on pratique deux essais à 2 concentrations en substrat différentes à pH 3,8. Le substrat est dissout dans le tampon citrate phosphate pH 3,8 de façon à obtenir dans le mélange réactionnel une concentration en substrat, soit de 1 mM, soit de 10 mM.

Solution de substrat dans le tampon	50 μ l
Tampon citrate phosphate pH 3,8	20 μ l
Prise d'essai de l'échantillon	10 μ l

Le mélange réactionnel est incubé et la réaction est arrêtée comme précédemment.

Pour l'étude de l'influence du pH, le substrat est préparé dans l'eau bidistillée à une concentration double de la concentration habituelle et la réaction est réalisée comme suit :

Solution de substrat	25 μ l
Tampon citrate phosphate	45 μ l
Prise d'essai de l'échantillon	10 μ l

Pour l'étude de l'action des effecteurs, ceux-ci sont mis en solution dans le tampon citrate phosphate et leur concentration dans la solution de tampon est 4 fois plus forte que dans le mélange réactionnel.

Les concentrations annoncées sont toujours celles du produit dans le milieu réactionnel

Les raisons du changement de technique seront exposées au cours de la discussion.



. sur le sérum :

Deux techniques ont été appliquées :

Technique de MASSON (191)

1 volume de sérum est dilué dans 10 volumes de tampon citrate-phosphate de Mac-Ilvaine au pH souhaité.

La réaction est réalisée comme suit :

Solution aqueuse de substrat 3,2 mM	100 μ l
Tampon citrate-phosphate	100 μ l
Prise d'essai de sérum dilué	200 μ l

La concentration en substrat du mélange réactionnel est de 0,8 mM.

L'incubation est de 3 heures et la réaction est arrêtée comme précédemment.

Technique d'après HUMBEL (129)

Solution aqueuse de substrat	50 μ l	
Tampon citrate (0,1M) phosphate disodique (0,2M)		50 μ l
Prise d'essai (sérum pur)	20 μ l	

La concentration en substrat dans le mélange réactionnel est de 1 mM.

Deux essais sont réalisés, l'un à pH 3,5 l'autre à pH 4,5.

Le mélange réactionnel est incubé 0, 30 minutes et 1 heure et la réaction est arrêtée comme précédemment.

. sur les cellules amniotiques : ultramicrométhode.

Les conditions d'étude sont celles des deux méthodes décrites pour les autres cellules, mais l'obligation, pour les cellules amniotiques, de travailler sur une petite quantité de cellules, nous a contraint à adapter ces méthodes à de très petits volumes. Nous donnons dans la figure 9 le schéma de la méthode



FIGURE 9

1 - mélange réactionnel
(substrat + tampon)
0,007 ml

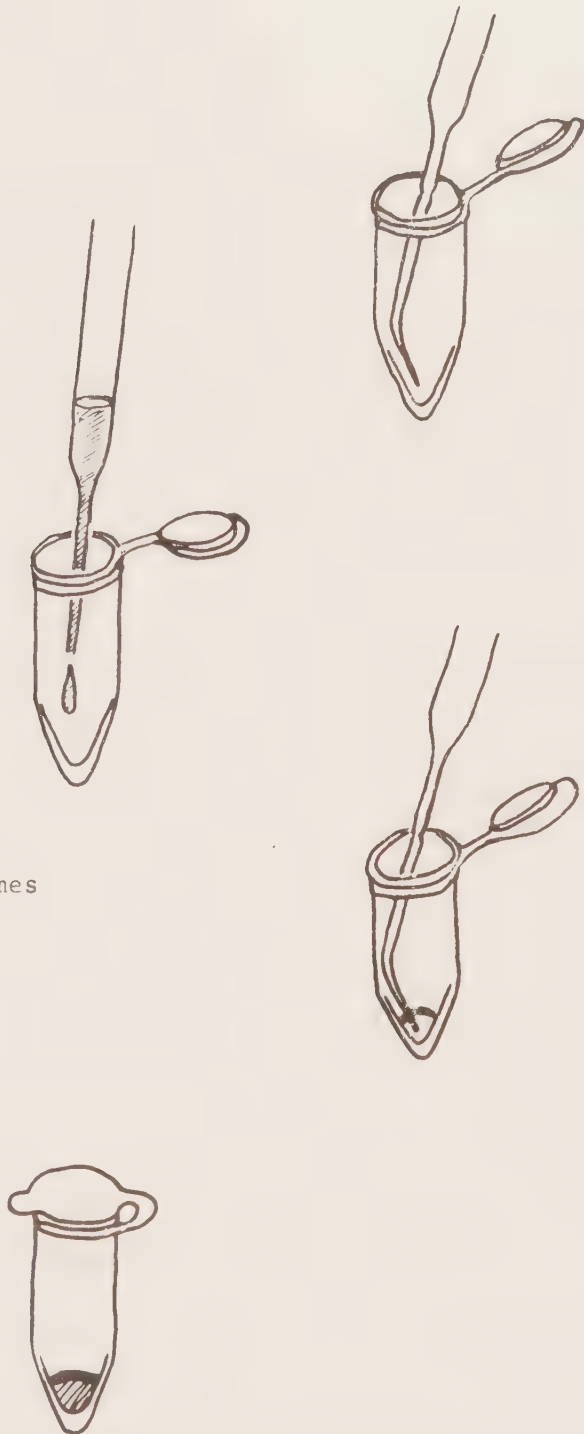
2 - Huile de paraffine :
1 goutte

3 - Lysat de cellules amniotiques
0,001 ml (0,15 à 1,0 microgrammes
de protéines).

4 - Incubation à 37° C
(chaque essai en triple).

5 - Arrêt de la réaction par 200 microlitres de tampon carbonate de
sodium pH 10,5.

6 - Mesure de la fluorescence à l'aide d'une microcuve sur un spectro-
fluorimètre AMINCO



DETERMINATION DE L'ALPHA D MANNOSIDASE

SUR LES CELLULES AMNIOTIQUES CULTIVEES AVEC LE SUBSTRAT MU



que nous avons mise au point.

Pour éviter l'évaporation, l'incubation se fait dans un godet de type Beckman bouché sous une goutte d'huile de parafilm et les temps d'incubation ont été portés à 3 et 4 heures.

La réaction est finalement arrêtée par addition de 200 microlitres de tampon bicarbonate - carbonate de sodium 0,5 M pH 10,5.

- Mesure de la fluorescence

La fluorescence du produit de réaction est finalement mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre Aminco Bowman :

longueur d'onde d'excitation : 362 nm

longueur d'onde d'émission : 448 nm

comparativement à une solution étalon de méthylumbelliférone.

L'appareil est muni d'un adaptateur avec microcuve cylindrique pour les faibles quantités.

I.3.3. - Détermination d'activité des autres hydrolases acides

Les activités de la Beta D glucosidase (EC.3.2.1.21), la beta D-galactosidase (EC.3.2.1.23) et l'arylsulfatase A (EC.3.1.6.1) ont été déterminées respectivement par les techniques de BEUTLER (19) VAN HOOFF et HERS (316) et PERCY et BRADY (240).

L'activité de la N-acétyl Beta D glucosaminidase (EC.3.2.1.30) a été déterminée selon la technique de KABACK (146) modifiée par NADLER (communication personnelle).



La détermination d'activité de l'alpha L fucosidase (EC.3.2.1.51) a été pratiquée d'après la technique de WOOD (337).

I.3.4. - Mesure du taux de protéines.

Elle est faite par la méthode de LOWRY (177).

I.3.5. - Electrophorèse de l'alpha D mannosidase

Elle a été effectuée sauf pour la révélation, selon la technique de POENARU (250).

Il s'agit d'une électrophorèse sur acétate de cellulose (cellogel Sebia) en tampon phosphate de potassium 0,04 M pH 5,5.

On applique 10 volts/cm pendant 2 heures.

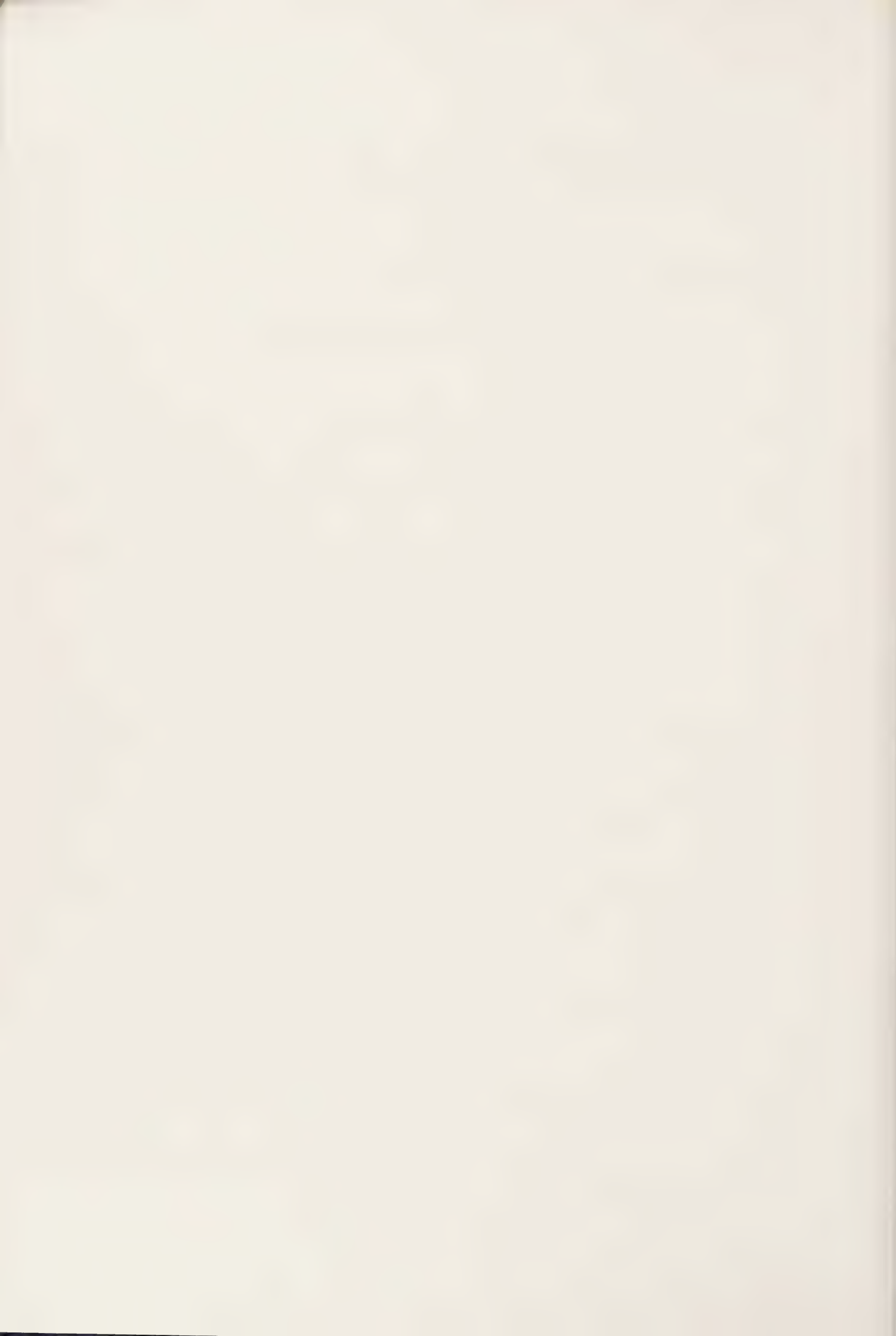
Le mélange réactionnel est constitué de 4 methylumbelliferyl alpha D mannopyranoside dissout dans du tampon citrate (0,1M) phosphate disodique (0,2M) à pH 3,5, 4,5 ou 6,5 mais la concentration finale du substrat dans le tampon a été portée à 5 mM (c'est à dire que le substrat est 10 fois plus concentré que dans la technique initiale de POENARU).

Ce mélange révélateur imprègne une bande de papier filtre appliquée sur la bande de cellogel ; le tout est enveloppé dans du papier aluminium et placé 30 minutes à l'étuve à 37° C.

La fluorescence est ensuite révélée par alcalinisation obtenue par exposition aux vapeurs d'ammoniac et observée sous ultra-violets.

I.3.6. - Focalisation électrique sur plaque

Elle a été réalisée à l'aide d'un appareil LKB 2117 Multiphor selon le protocole suivant :



- confection du gel de polyacrylamide

- . solution d'acrylamide à 29,1 % (poids pour volume) dans l'eau distillée : 10 ml
- . solution de N N' méthylène bis acrylamide à 0,9 % (poids pour volume) dans l'eau distillée : 10 ml
- . solution de saccharose (7,5 g dans 36 ml d'eau distillée): 36 ml
- . solution d'ampholine permettant d'assurer un gradient de pH sensiblement linéaire entre pH 3,5 et 9,5.
 - ampholine pH 3,5 - 10 (LKB 1809 - 101) 2,8 ml
 - ampholine pH 9 - 11 (LKB 1809 - 146) 0,4 ml
 - ampholine pH 4,0 - 6,0 (LKB 1809 - 116) 0,2 ml
 - ampholine pH 5,0 - 7,0 (LKB 1809 - 121) 0,2 ml

Le mélange est dégazé sous vide et on ajoute pour la polymérisation 0,8 ml de solution extemporanée de riboflavine à 0,04 % (poids pour volume) dans l'eau distillée.

Le mélange est alors introduit entre les plaques de verre dégraissées à l'alcool et mis à polymériser 1 heure sous une rampe lumineuse.

- dépôt des échantillons

Les échantillons centrifugés à 20.000 g environ (à +4° C pendant 20 minutes) (dans une ultracentrifugeuse réfrigérée MSE superspeed 65) sont déposés sur de petits morceaux de papier Whatmann de 10 X 10 mm (2 papiers peuvent être superposés si la quantité à déposer est importante).

- migration

Elle est conduite de façon à régler au début un courant constant de 50 mA puis quand le voltage augmente, l'ampérage diminue ; au cours de l'opération il faut constamment vérifier que la puissance n'excède pas 35 Watts pour ce type de gel.



- révélation

Nous avons mis au point une méthode de révélation par l'application à la surface de ce gel de polyacrylamide d'un gel d'agar contenant le substrat et préparé comme suit :

2 fois 0,2 g d'agar noble sont dissous séparément à chaud dans 10 ml d'eau distillée.

On ajoute alors :

. à l'un des erlens 33,5 mg de 4 methylumbelliferyl alpha D manno-pyranoside dissous dans 10 ml de tampon citrate (0,1 M) phosphate disodique (0,2 M) pH 3,5.

. à l'autre erlen 33,5 mg de substrat dissous dans 10 ml de même tampon à pH 6,5

(ce qui réalise dans le gel une concentration en substrat de 5 mM).

Le gel d'agar renfermant le substrat est coulé sur le gel de polyacrylamide à une température de l'ordre de 37 - 40° C : celle-ci ne doit en effet, être ni trop élevée pour altérer l'enzyme, ni trop basse pour risquer la prise prématurée du gel.

Puis l'exposition aux vapeurs d'ammoniac révèle la fluorescence observée sous ultra-violet.

I.3.7. - La focalisation électrique en colonne réalisée dans le service du Professeur LOUISOT sera expliquée à propos de la détermination du point isoélectrique de l'alpha mannosidase B placentaire

Expression des résultats des mesures d'activité enzymatique

L'unité employée est la milliunité internationale : c'est la quantité d'enzyme qui hydrolyse une nanomole de substrat par minute dans les conditions expérimentales.



II - RESULTATS

II.1. - LE DIAGNOSTIC A L'ORIGINE DE L'ETUDE

- Etude des hydrolases acides dans les leucocytes de Saliha B.

Le prélèvement de sang nous avait été adressé pour bilan de maladie de surcharge (présence de lymphocytes vacuolés dans le sang périphérique) sans mucopolysaccharidurie.

L'étude des hydrolases acides que nous avons alors pratiquée est rapportée dans le tableau 9 :

TABLEAU N° 9

Détermination d'activité des hydrolases acides dans les leucocytes de Saliha B.

HYDROLASES ACIDES	Activités en mU/mg de protéines	
	MALADE	TEMOINS
Beta-D-glucosidase pH 4	36,5 . 10 ⁻³	20 à 85 . 10 ⁻³
pH 5,3	52,2 . 10 ⁻³	24 à 110 . 10 ⁻³
Beta-D-galactosidase pH 3,6	2,3	2 à 4,0
N-acétyl Beta D glucosaminidase pH4,4		
Activité totale	8,4	6 à 15
% activité thermolabile (à 50° 3 H.)	61,7 %	52 à 70 %
électrophorèse	profil normal	
Arylsulfatase A	1,0	0,85 - 1,8
Alpha D Mannosidase ((S) = 7,8 mM)		
pH 4	0,11	1,1 à 4,5
pH 5,2	0,42	0,75 à 2,9



Toutes les activités étudiées sont dans les limites des contrôles sauf l'alpha D mannosidase qui apparait comme franchement déficitaire.

- Détection des oligosaccharides dans l'urine

Le chromatogramme (photo 1) révèle la présence de trois bandes de RF inférieure au lactose très caractéristiques de la mannosidose.



II.2. - ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE DANS LE SERUM

- Influence du pH sur l'activité (technique de HUMBEL (129)).

La figure 10 fait apparaître que l'activité à pH acide est faible et qu'il existe une importante activité intermédiaire de pH optimal 5,2 - 5,4 qui apparaît encore plus nettement quand on augmente la concentration en substrat.

Chez notre malade Saliha B., le taux d'activité est extrêmement faible en dessous de pH 3,5. Par contre, l'activité intermédiaire est élevée.

Chez sa mère, l'activité à pH 3,5 est très faible (22,5 % de celle des témoins) par contre, comme pour Saliha, l'activité intermédiaire est importante. Il faut toutefois signaler que Madame B. était enceinte d'un fœtus atteint de mannosidose au moment de l'examen.

- Influence de la concentration en substrat au pH optimal 5,4

La cinétique observée est de type Michaelien. La représentation de LINEWEAVER et BURK nous a permis de déterminer les valeurs de la K_m :

- . pour les contrôles 14,7 - 15,1 - 20,8 - 15,1 - 20,8 et 19,2 mM
- . pour Saliha B. : 18 mM.

L'activité intermédiaire la plus importante quantitativement dans le sérum, apparaît donc tout à fait normale chez notre malade.

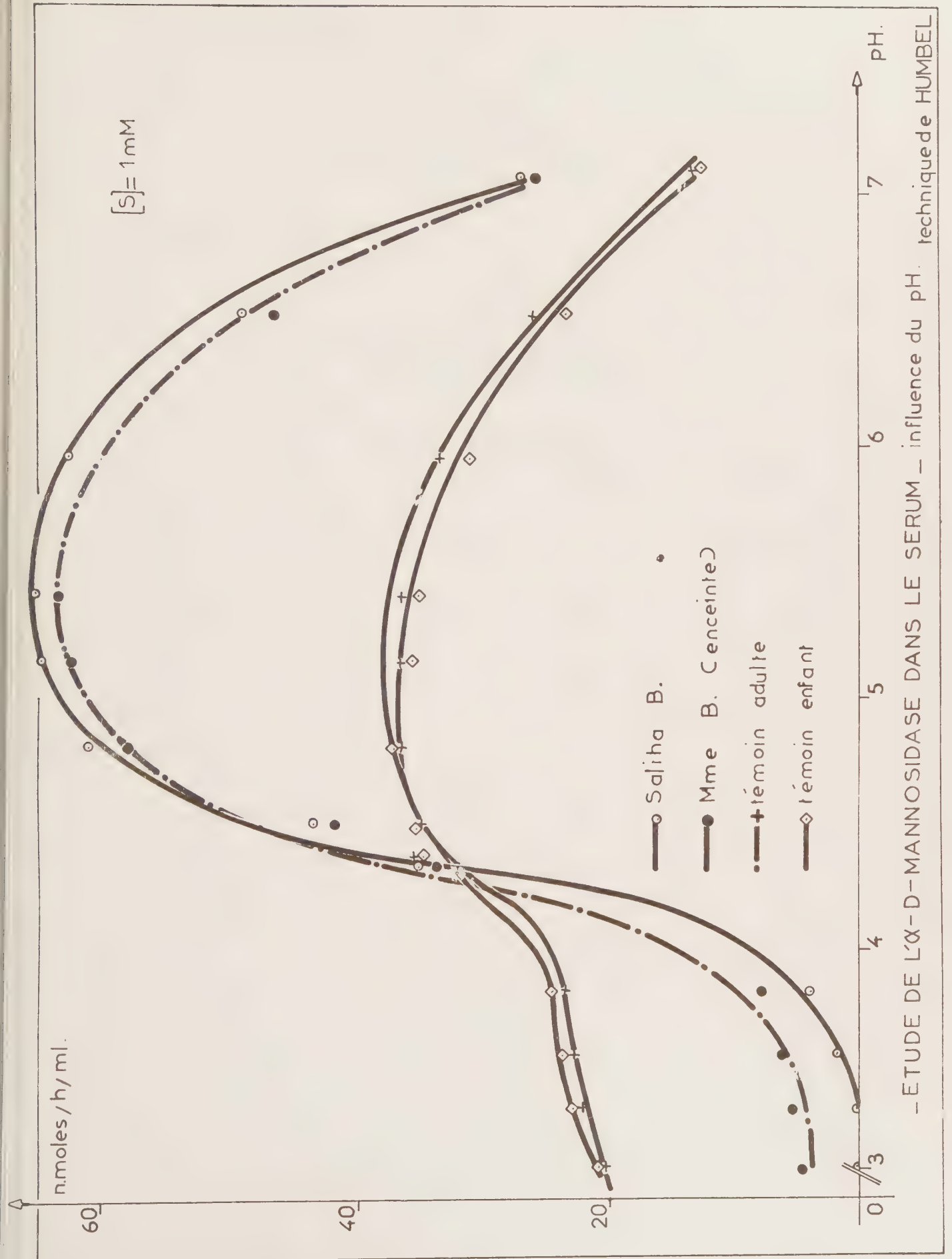
- Les résultats comparatifs des techniques de MASSON (191) et HUMBEL (129)

Ces deux techniques diffèrent essentiellement par :

- . le pH d'étude 3,5 pour HUMBEL
4,4 pour MASSON
- . la concentration en substrat MU 1 mM pour HUMBEL
0,8 mM pour MASSON



FIGURE 10





- . le temps d'incubation 1 Heure pour HUMBEL
3 Heures pour MASSON
- . la dilution de l'échantillon dans le mélange réactionnel
au 1/6e pour HUMBEL
au 1/22e pour MASSON

Technique de HUMBEL

TABLEAU 10

Activité de l'alpha D mannosidase dans le sérum
Technique de HUMBEL

	Alpha D Mannosidase		$\frac{\text{Man } 3,5}{\text{Man } 4,5}$
	pH 3,5	pH 4,5	
Contrôles (HUMBEL)	22,0 → 54,2	38,4 → 72	0,426 - 0,787
Témoin 1 (adulte)	22,5	35,5	0,634
Témoin 2 (enfant)	23,2	35,5	0,654
Saliha B.	<u>1</u>	51,5	<u>0,019</u>
Mme B. (enceinte)	<u>5,5</u>	49,3	<u>0,11</u>
Mohammed B. (prématuré)	7,3	6,6	1,1
Jaliha B. (prématurée)	9,8	10,6	0,92
Témoin enfant (2 mois)	22,7	22,2	1,02

Man = activité de l'alpha D mannosidase en nanomoles / h / ml à pH 3,5
(Man 3,5), ou à pH 4,5 (Man 4,5)



En suivant cette technique, l'activité à pH 4,5 n'est absolument pas discriminante et la comparaison à l'activité de l'hexosaminidase n'apporte rien de plus. Par contre, l'activité à pH 3,5 nous a paru intéressante.

Pour les jumeaux indemnes, Jaliha et Mohammed (nés prématurés) les taux d'activité trouvés sont faibles aux 2 pH (3,5 et 4,5) ; il conviendrait de vérifier les taux d'activité habituels chez les prématurés (car l'activité de l'alpha D mannosidase dans les leucocytes de ces deux enfants est tout à fait normale). Nous avons conclu qu'ils n'étaient pas atteints de mannosidose ni même probablement hétérozygotes : le rapport des activités de l'enzyme aux 2 pH (3,5 / 4,5) n'étant pas diminué. Néanmoins ces résultats devront être contrôlés chez ces enfants quand ils seront plus âgés.

Technique de MASSON

TABLEAU 11

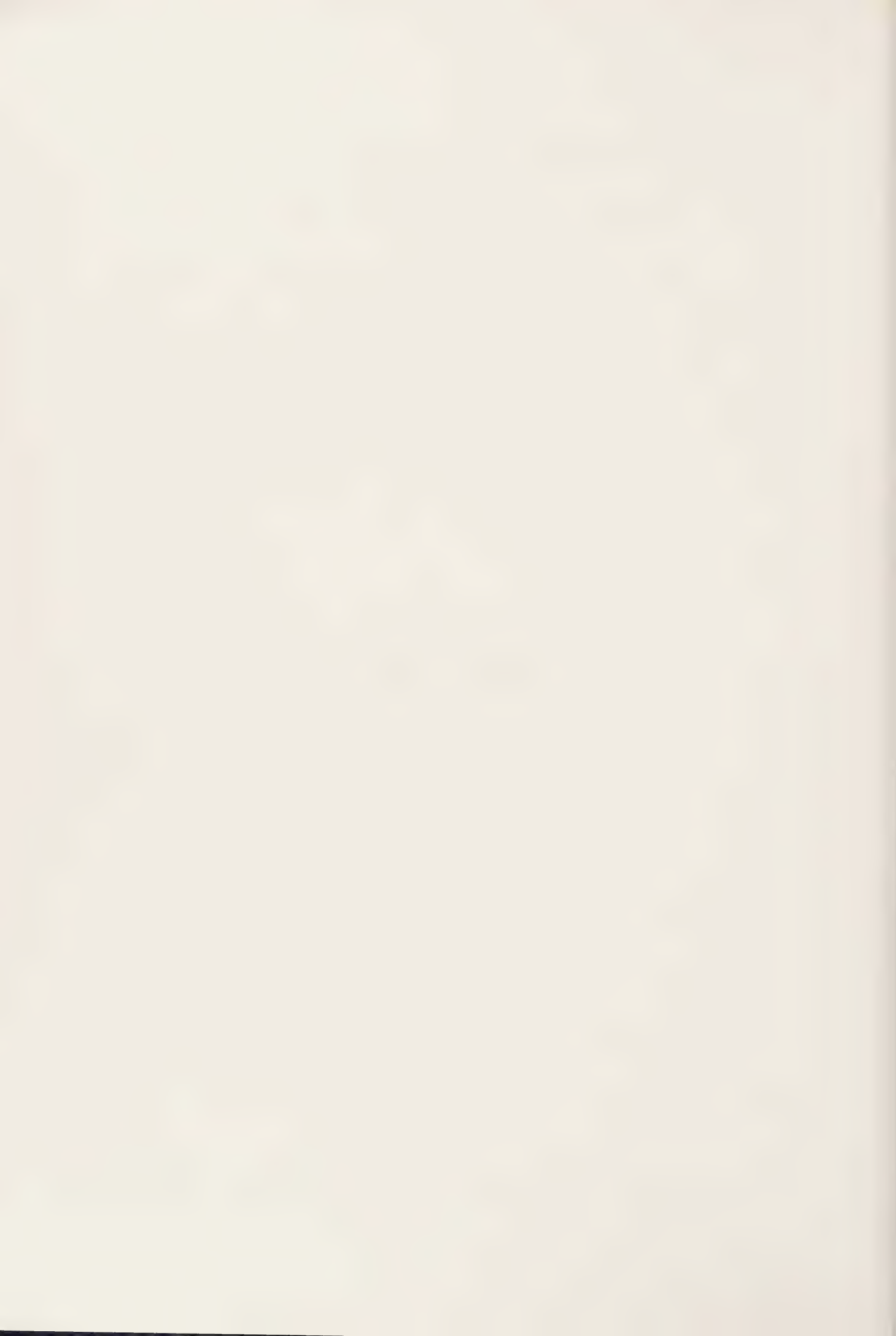
Activité de l'alpha D mannosidase dans le sérum
Technique de MASSON

:	:	:	:	:	:	:	:
:	Man	Hex.	Hex 4,4	Man 6,0	Man	Man 3,5	:
:	4,4	4,4	Man 4,4	Man 4,4	3,5	Man 4,4	:
:	:	:	:	:	:	:	:
:	Témoin	16,4	738	45	2,2	7,0	0,43
:	:	:	:	:	:	:	:
:	Mme B.	2,8	996	356	14,1	1,3	0,46
:	(enceinte)	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:
:	Saliha B.	0,85	684	805	50,0	0,0	-
:	:	:	:	:	:	:	:

Man = activité de l'alpha D mannosidase en nanomoles par heure par ml à pH 4,4 (Man 4,4), 3,5 (Man 3,5) et 6,0 (Man 6,0).

Hex = activité de l'hexosaminidase en nanomoles par heure par ml de sérum à pH 4,4.

Notre technique de détermination d'activité de l'hexosaminidase donne des valeurs plus élevées que celles rapportées par MASSON ; ceci entraîne une



valeur numérique différente pour le rapport Hex 4,4 / Man 4,4, mais dans notre expérience cette technique reste tout à fait discriminante. Les activités pour l'alpha mannosidase obtenues par la technique de MASSON sont plus faibles que dans la technique de HUMBEL ; la différence de concentration en substrat peut l'expliquer mais d'autres facteurs interviennent sans doute ; le temps d'incubation long joint à la grande dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel (1/22e contre 1/6e dans la technique de HUMBEL), peut révéler une certaine instabilité de l'enzyme dans ces conditions.





2eme Méthode : étude de l'activité à pH 3,8 et à 2 concentrations en substrat
1 mM et 10 mM

TABLEAU 13

Etude de l'alpha D mannosidase dans les leucocytes
((S) = 1 et 10 mM - pH = 3,8)

	Man mU/mg de protéines		
			Man 10 mM
			Man 1 mM
	Man 1 mM	Man 10 mM	
Controles (50)			
Moyenne	1,95	3,80	1,87
Valeurs extrêmes	0,80 - 4,0	1,60 - 7,8	1,4 - 2,3
Mohammed B.	1,5	2,5	1,7
Jaliha B.	1,4	2,1	1,5
Saliha B.	<u>0,012</u>	<u>0,29</u>	≈ 24
Farida B.	<u>0,015</u>	<u>0,20</u>	≈ 13
Sylvie N.	<u>0,010</u>	<u>0,20</u>	≈ 20

Le déficit enzymatique chez les malades est d'autant plus patent que la concentration en substrat est plus faible et pour une concentration en substrat de 1 mM l'activité est tout juste détectable.

Les activités de l'alpha D mannosidase chez les jumeaux (Mohammed et Jaliha) sont par contre tout à fait comparables à celles des contrôles et le rapport des activités aux 2 concentrations de substrat est tout à fait normal.

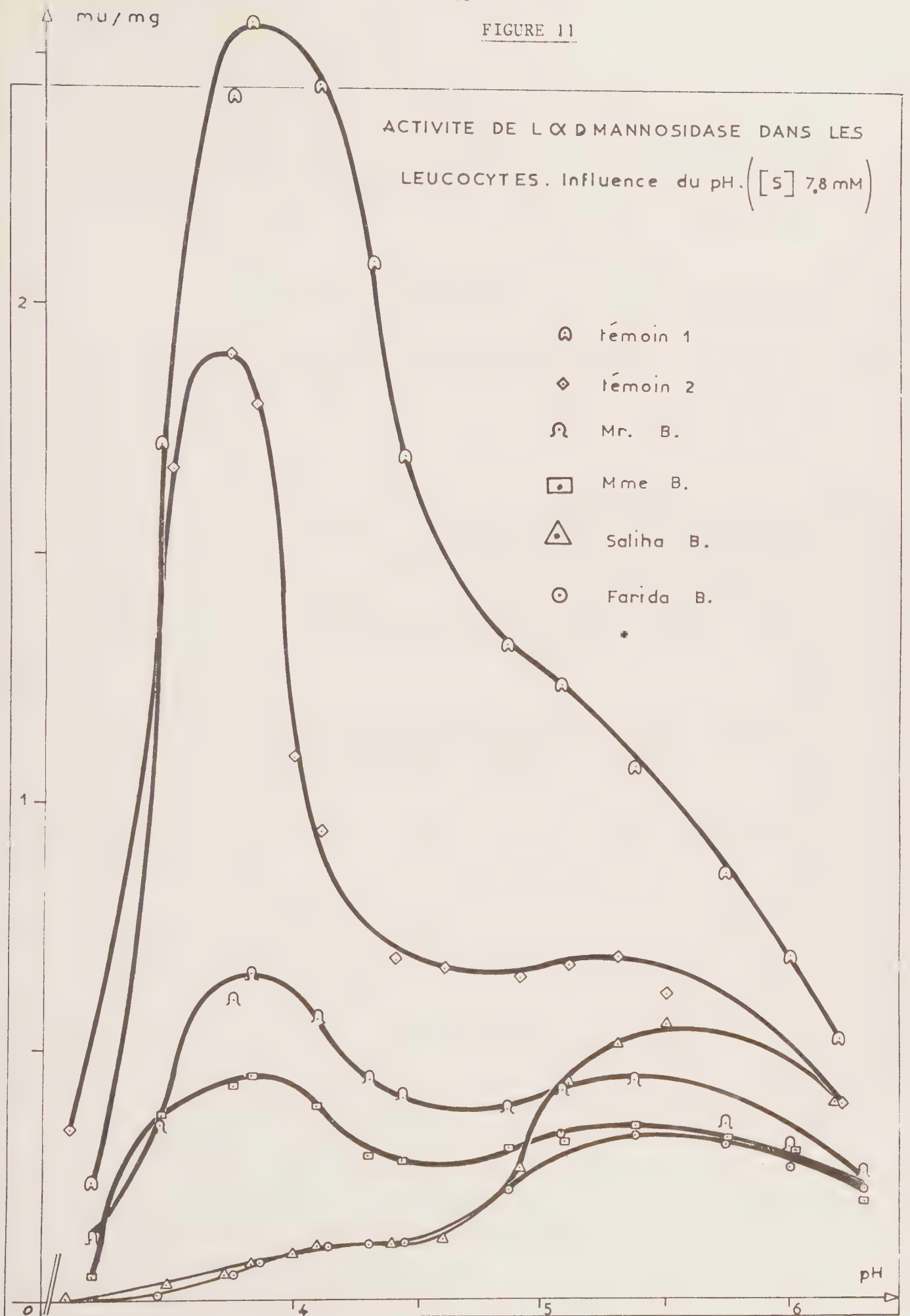
b) Influence du pH (Figure 11).

A concentration élevée en substrat (7,8 mM), la forme acide est prédominante dans les leucocytes. L'autre forme, de pH optimal voisin de 5,6,



FIGURE 11

ACTIVITE DE L'α D MANNOSIDASE DANS LES
LEUCOCYTES. Influence du pH. ([S] 7.8 mM)





n'est bien visible que chez les malades du fait du déficit en forme acide ; chez les contrôles, elle n'est généralement observée que sous forme d'un épaulement voir d'une simple asymétrie de la courbe.

c) Influence de la concentration en substrat à pH 3,8

La figure 12 met en évidence chez les témoins une cinétique de type Michaelis ; les constantes de Michaelis ont été trouvées égales 1,4, 1,6, 1,45, 2,2, 2,0 mM.

Les 3 malades étudiés (figure 13) présentent des cinétiques anormales en particulier aux faibles concentrations en substrat ; d'autre part, l'activité de l'enzyme est chez eux beaucoup moins inhibée par un excès de substrat. C'est l'anomalie de cette cinétique qui est objectivée par l'augmentation du rapport des activités aux concentrations en substrat 10 mM / 1 mM.

d) Influence des ions métalliques Zn^{++} 1,0 mM et Co^{++} 5,0 mM en fonction de la concentration en substrat à pH 3,8

La figure 14 montre que le zinc (1 mM dans le mélange réactionnel) est très activateur :

- à la fois chez le témoin (il diminue la K_m et augmente la vitesse maximale pour le substrat MU),
- et chez le malade.

Quant au cobalt (5 mM dans le mélange réactionnel) :

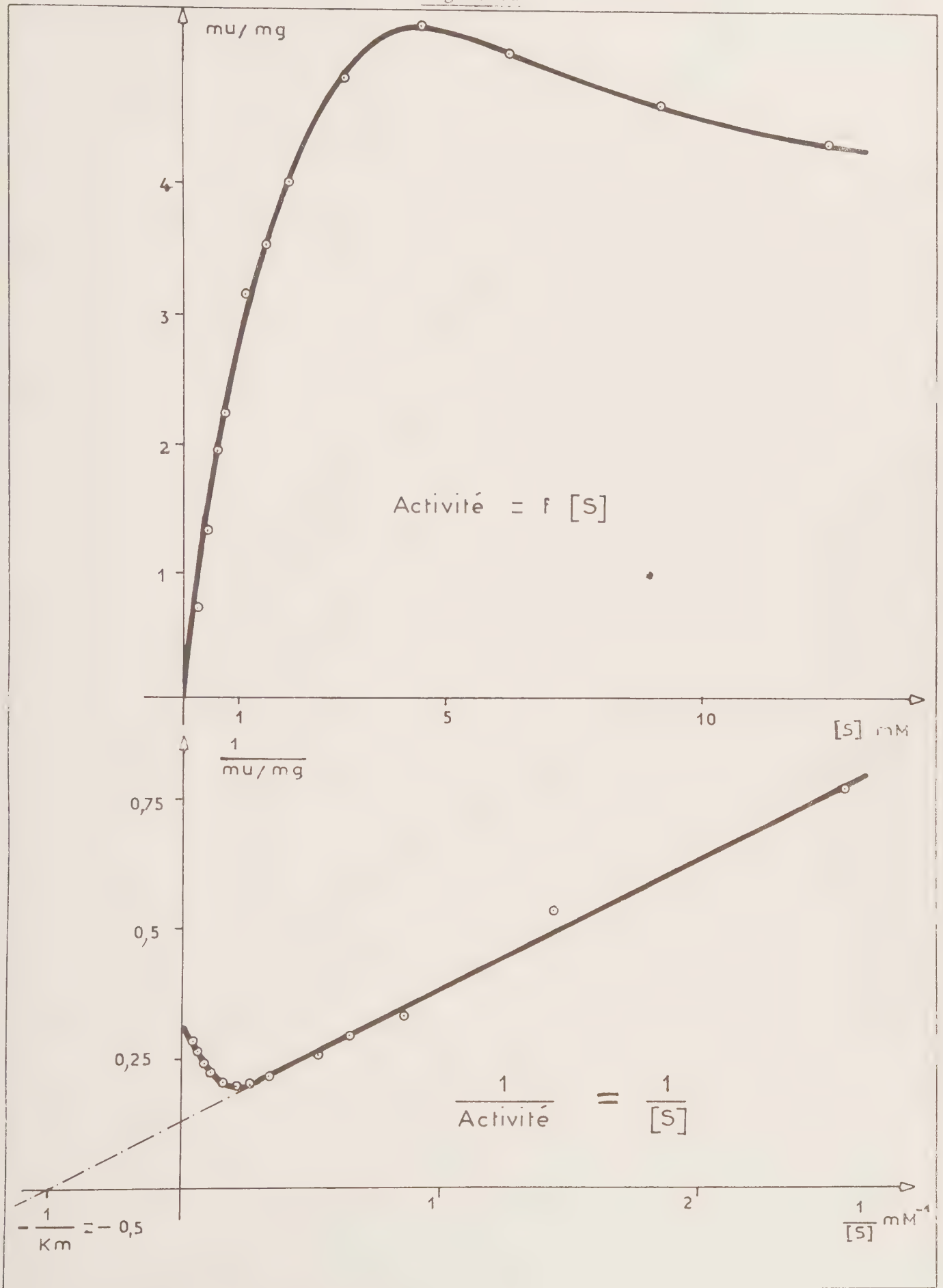
- il inhibe légèrement l'activité du témoin (il augmente sa K_m et diminue sa V_m pour le substrat MU),
- il stimule par contre l'activité du malade surtout aux faibles concentrations en substrat où son action est beaucoup plus importante que celle du zinc ; par contre, aux concentrations élevées en substrat, il stimule moins l'enzyme du malade que le zinc.



ACTIVITE DE L'α D MANNOSIDASE DANS LES LEUCOCYTES D'UN TEMOIN

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT A pH 3,8

Figure 12

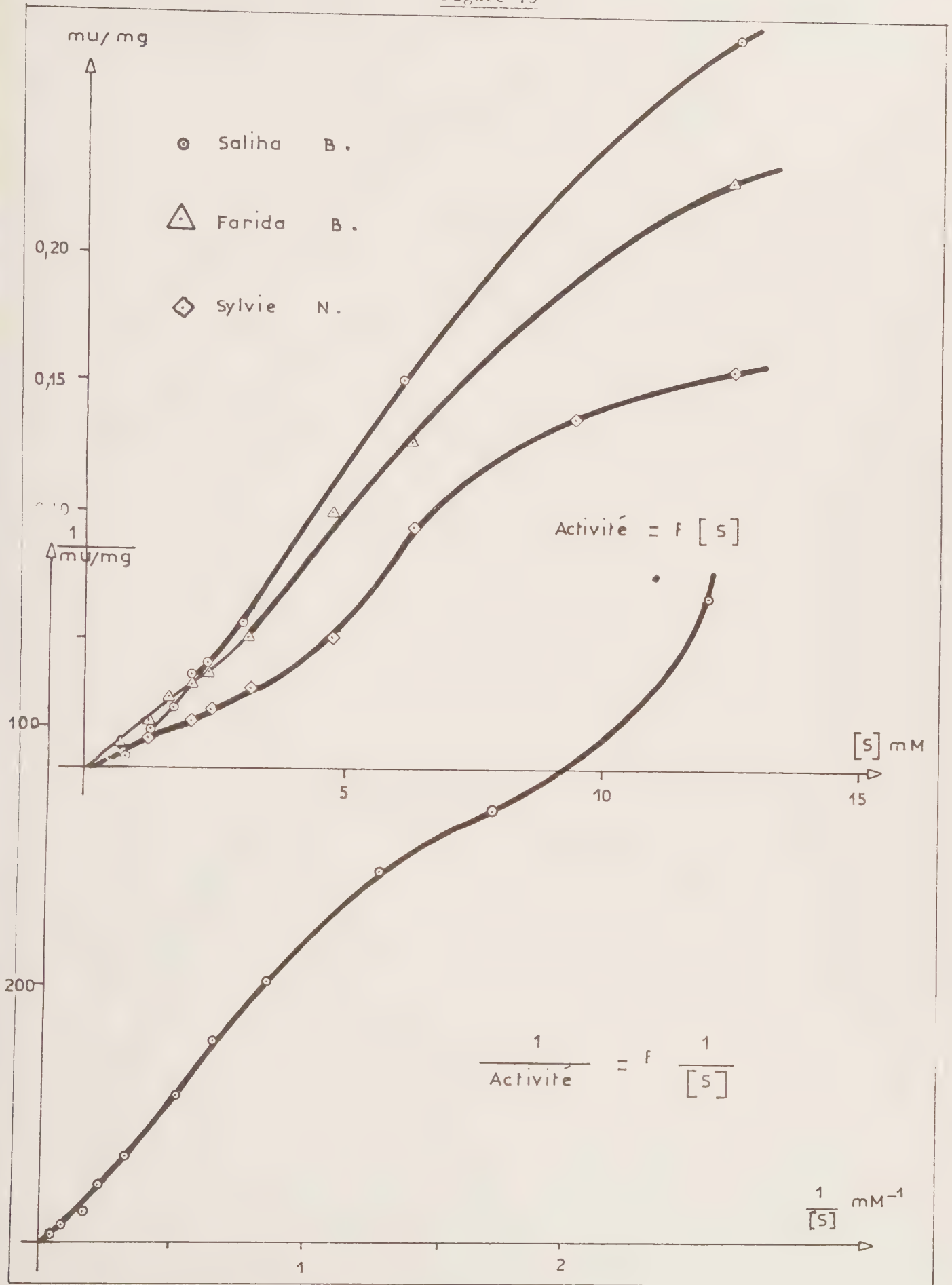


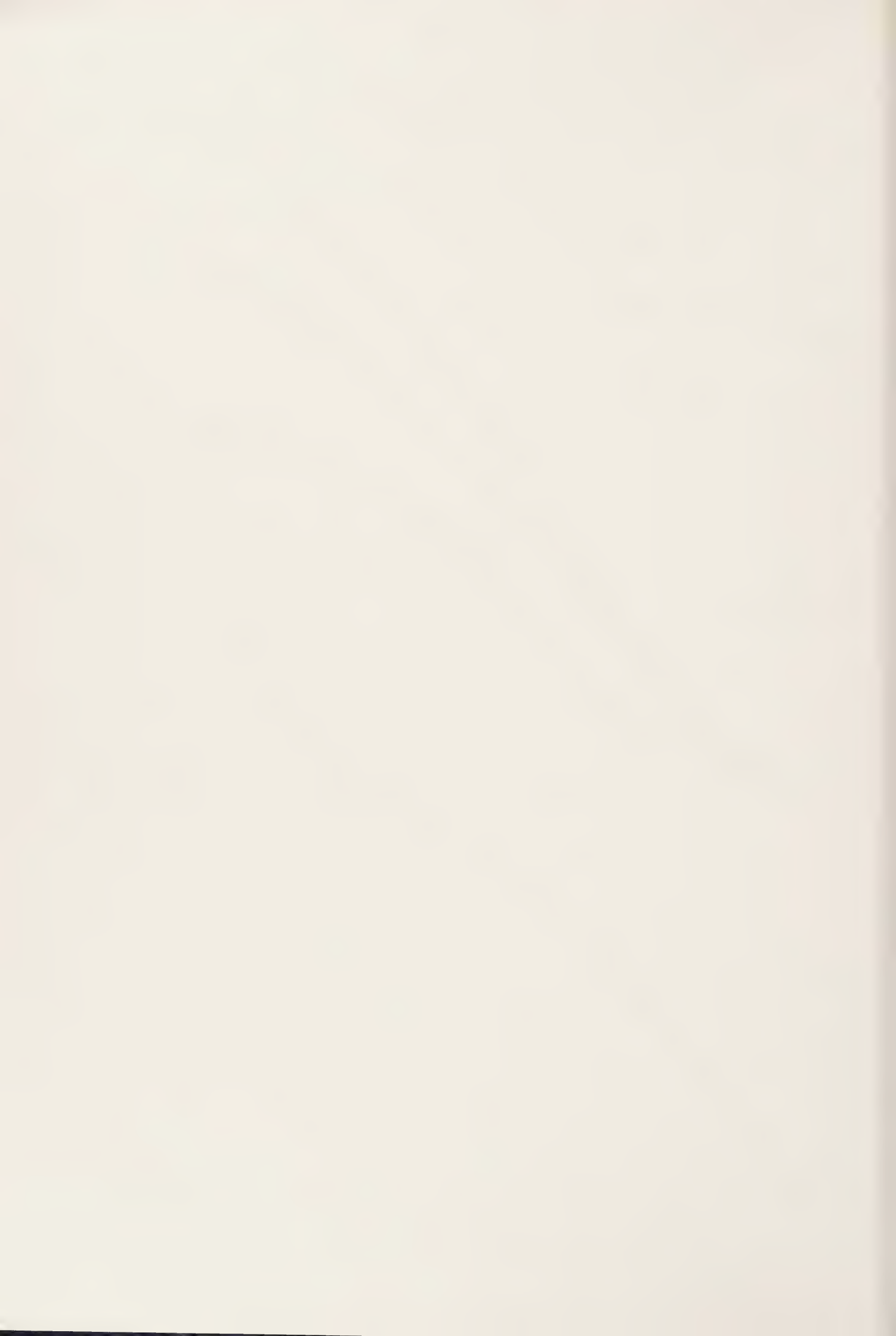


ACTIVITE DE L'α D MANNOSIDASE DANS LES LEUCOCYTES DES MALADES

Influence de la concentration en substrat à pH 3,8

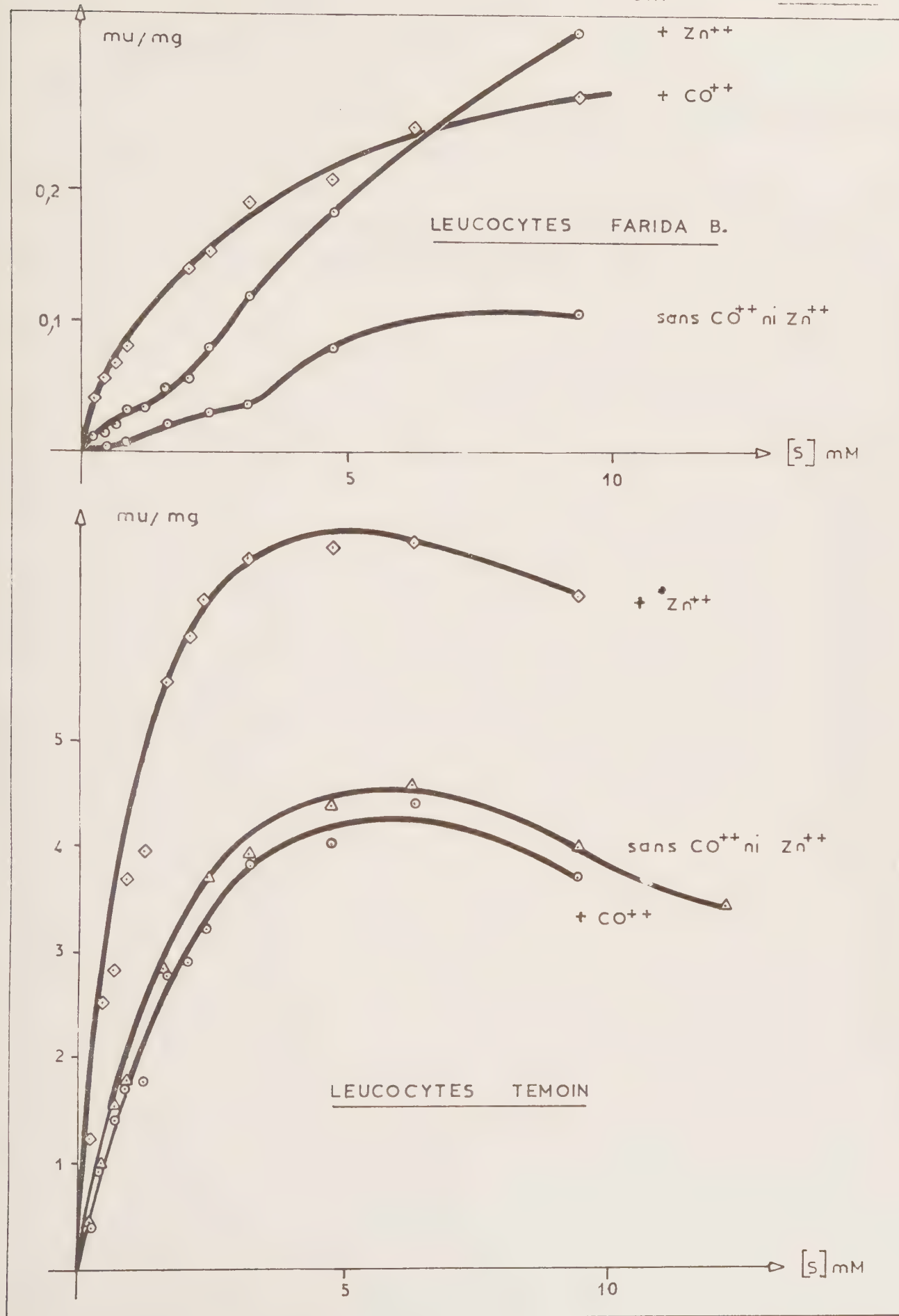
Figure 13





OX D MANNOSIDASE : INFLUENCE DES IONS CO^{++} (5mM) ET Zn^{++} (1,0mM) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT A pH 3,8 DANS LES LEUCOCYTES D'UN MALADE ET D'UN TEMOIN

FIGURE 14





e) Electrophorèse

L'électrophorèse sur acétate de cellulose révélée à pH 4,4 met en évidence :

- une intense bande fluorescente chez le témoin,
- une absence de bande fluorescente chez le malade (photo 2).



II.4. - ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE DANS LES FIBROBLASTES CUTANES

a) influence du pH

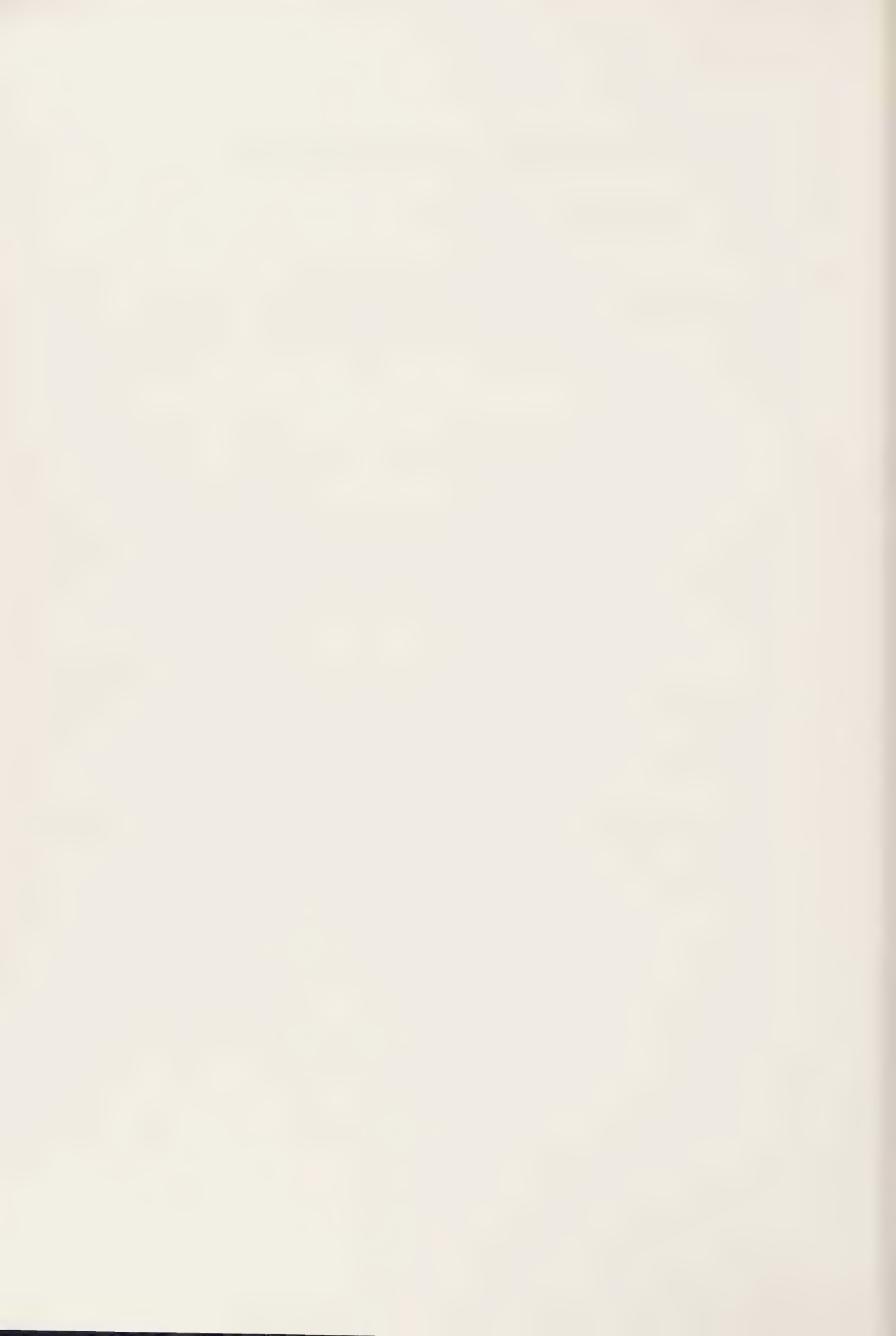
La figure 15 montre l'influence du pH sur l'activité de l'enzyme à 2 concentrations en substrat 1 mM et 7,8 mM. A faible concentration en substrat le déficit en alpha mannosidase acide apparait nettement chez les malades ; par contre, pour une concentration en substrat de 7,8 mM, il est beaucoup moins évident.

b) influence de la concentration en substrat MU

Son influence est capitale et la figure 15 comme la figure 16, visualisent nettement ce phénomène. Comme dans les leucocytes, la cinétique ne suit pas chez les malades une courbe de type MICHAELIS MENTEN. De plus, dans les fibroblastes, aux concentrations élevées, l'activité enzymatique chez les malades, ne se différencie plus de celle des témoins.

Cet aspect distingue la mannosidose de la mucopolysaccharidose de type II où l'activité alpha mannosidase est très faible à toutes les concentrations en substrat ; mais la cinétique est Michaelienne et la Km pour le substrat MU normale dans cette affection.

Chez les hétérozygotes, pour la mannosidase la représentation de LIVEWEAVER et BURK permet de calculer une Km légèrement supérieure à celle des 10 témoins testés : 2 à 2,6 mM contre 0,8 à 1,4 mM (tableau 14).



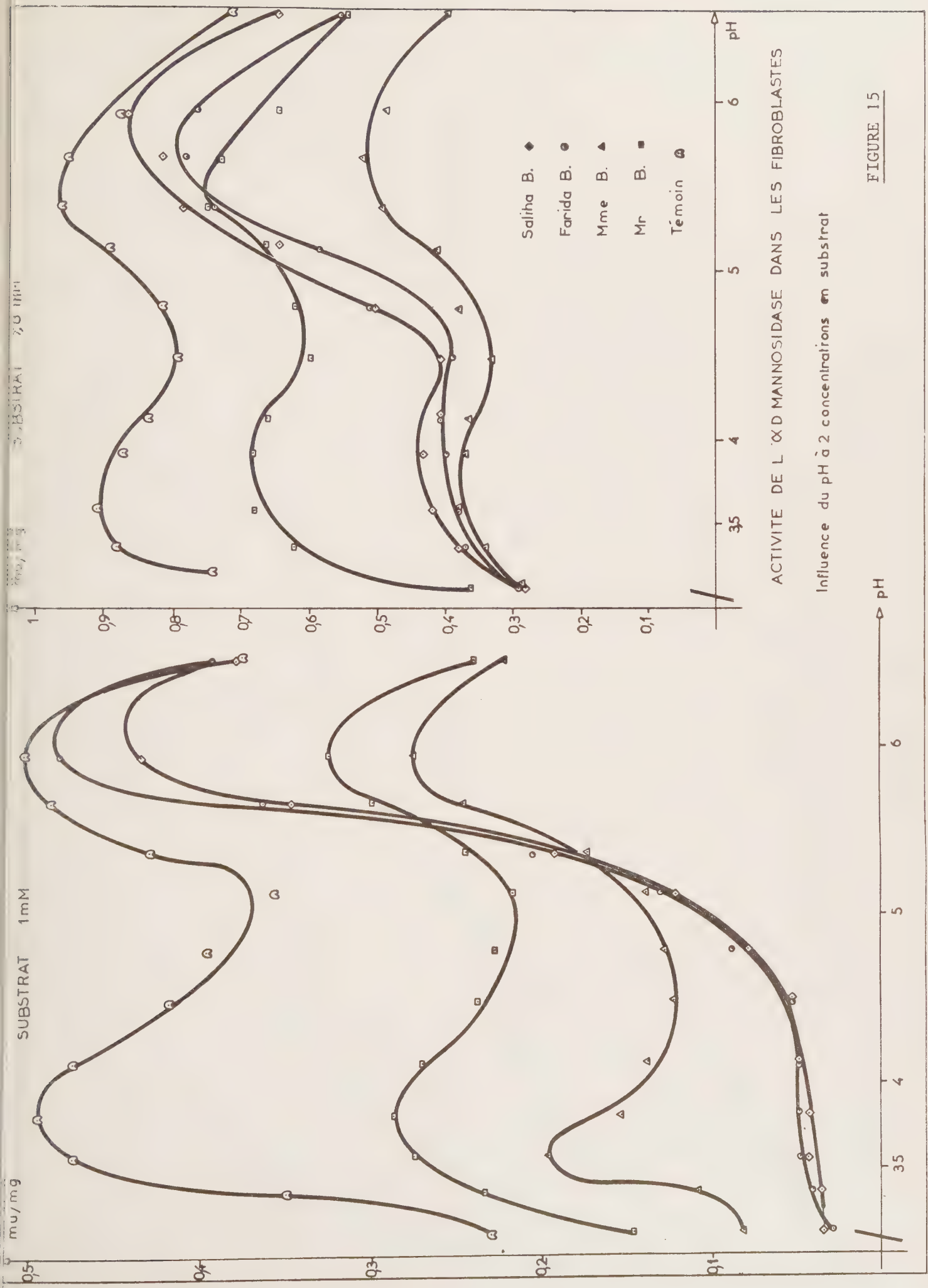
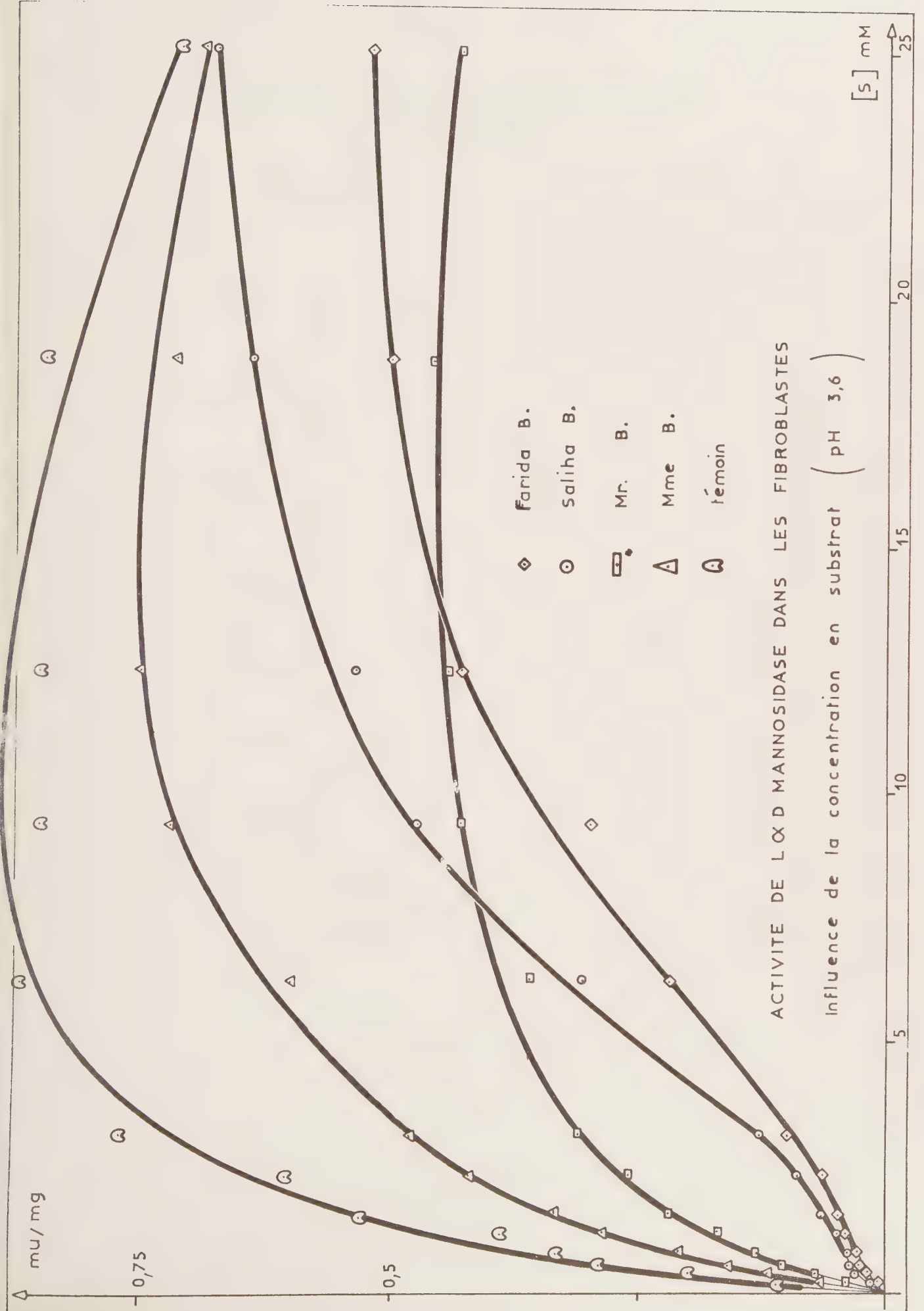


FIGURE 15



FIGURE 16



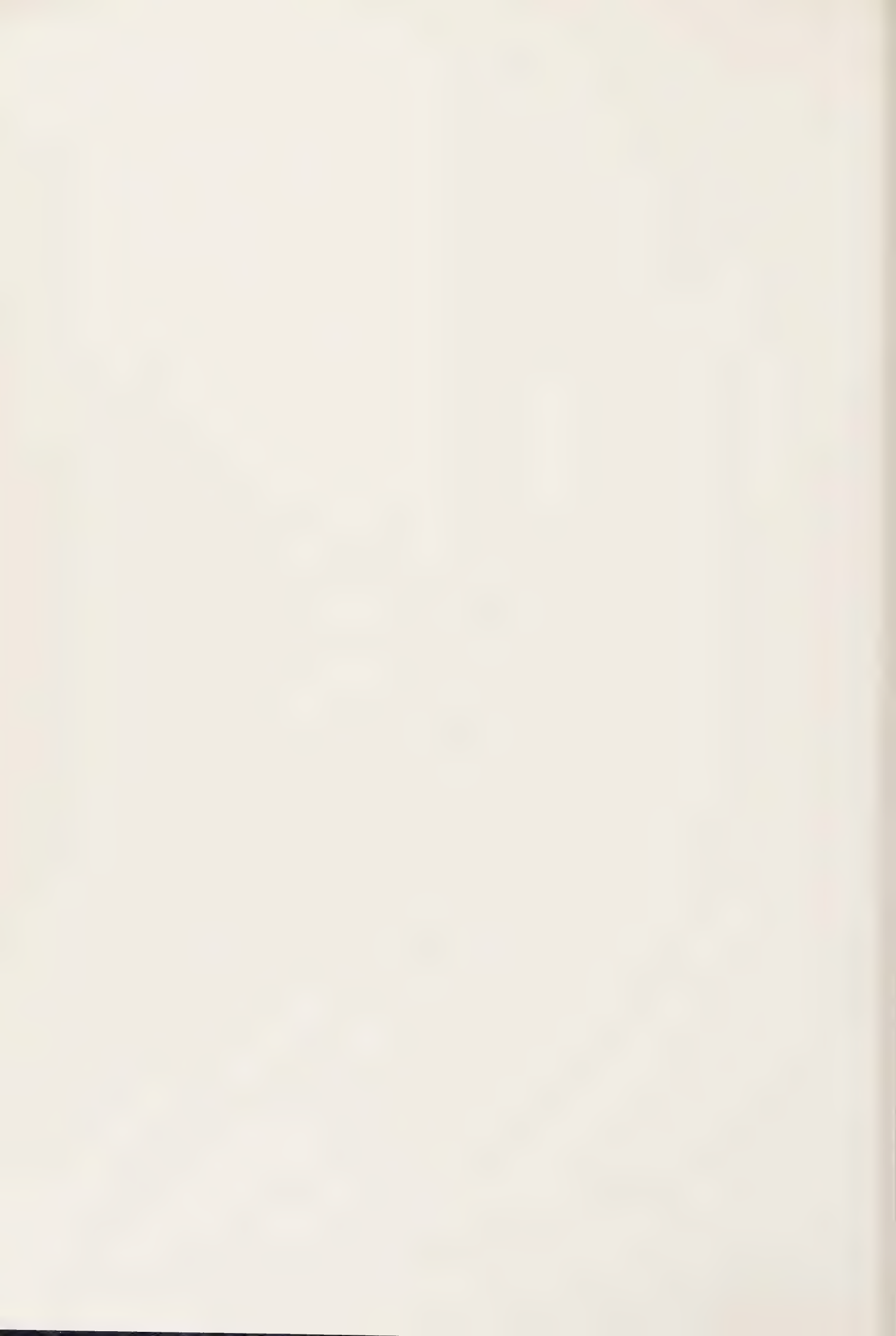


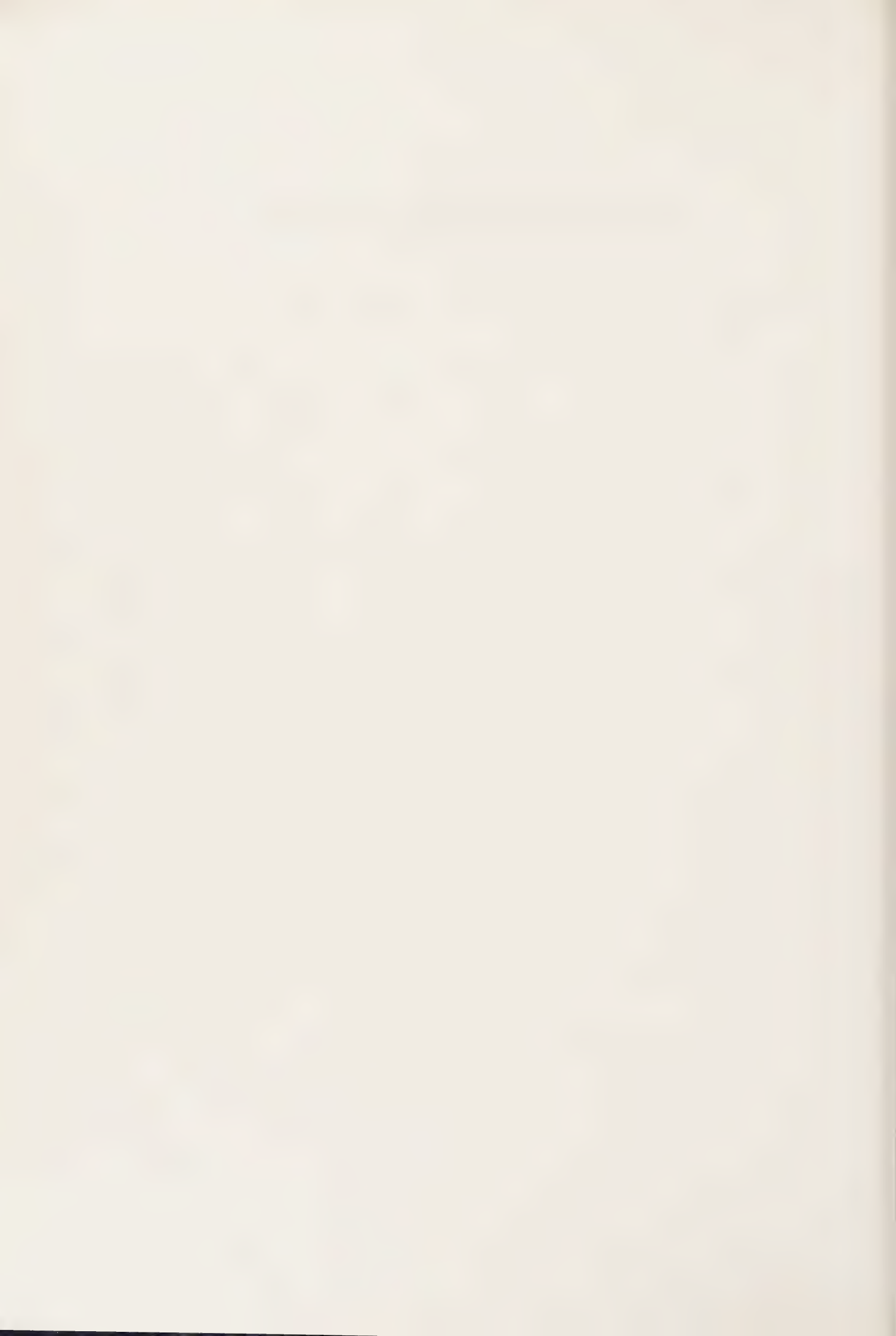
TABLEAU 14

Influence de la concentration en substrat sur
l'activité de l'alpha D mannosidase dans les
fibroblastes

Concentration en sub-		1 mM	7,8 mM	25 mM	Km
trat					
Farida B	Sub 4	0,054	0,34	0,59	cinétique non Michaelienne
	Sub 9	0,048	0,44	0,80	
	Sub 10	0,035	0,275	0,52	
Saliha B.	Sub 6	0,075	0,57	0,91	cinétique non Michaelienne
	Sub 10	0,041	0,425	0,71	
	Sub 11	0,047	0,41	0,68	
Mme B. (mère)	Sub 4	0,16	0,49-	0,58	2,3 - 2,6 mM
	Sub 5	0,12	0,325	0,43	2 - 2,5 mM
	Sub 6	0,23	0,67	0,685	2,4 - 2,5 mM
M. B. (père)	Sub 4	0,17	0,45	0,51	2 - 2,10 mM
	Sub 12	0,265	0,66	0,80	1,9 - 2,0 mM
	Sub 13	0,147	0,41	0,425	2,10 mM
Témoin 1	Sub 9	0,70	1,20	1,29	1 - 1,10 mM
Témoin 2	Sub 11	0,58	1,14	1,18	0,95 mM
Témoin 3	Sub 5	0,42	0,84	0,88	1,10 - 1,30 mM
Témoin 4	Sub 4	0,38	0,87	0,71	1,40 mM

Sub = subculture

Activité = milliunités par mg de protéines à pH 3,6



c) influence du cobalt et du zinc

- en fonction du pH (figure 17)

Chez le témoin :

- . le zinc déplace le pH optimal de la forme acide de 4 vers 3,7 et stimule notablement l'activité acide,
- . le cobalt déplace inversement le pH optimal de la forme acide de 4 vers 4,2 ; de plus il n'est ni inhibiteur ni activateur de cette forme acide, mais active énormément la forme de pH moins acide.

Chez le malade :

L'effet des ions sur la forme de pH optimal voisin de 6 est le même que chez le témoin ; sur la forme acide, le zinc a un effet activateur, mais moins efficace que chez le témoin ; par contre, le cobalt a un effet très activateur sur l'enzyme mutant.

- en fonction de la concentration en substrat à pH 3,6

Elle n'a été étudiée que chez un contrôle et dans un cas de mucopolipidose de type II. Malgré une activité résiduelle très faible dans la mucopolipidose de type II, l'effet des effecteurs est comparable à celui recherché dans les fibroblastes témoins :

- . le cobalt inhibe légèrement l'activité (en augmentant la K_m et en diminuant la vitesse maximale)
- . le zinc stimule franchement l'activité (en diminuant la K_m et en augmentant la vitesse maximale).

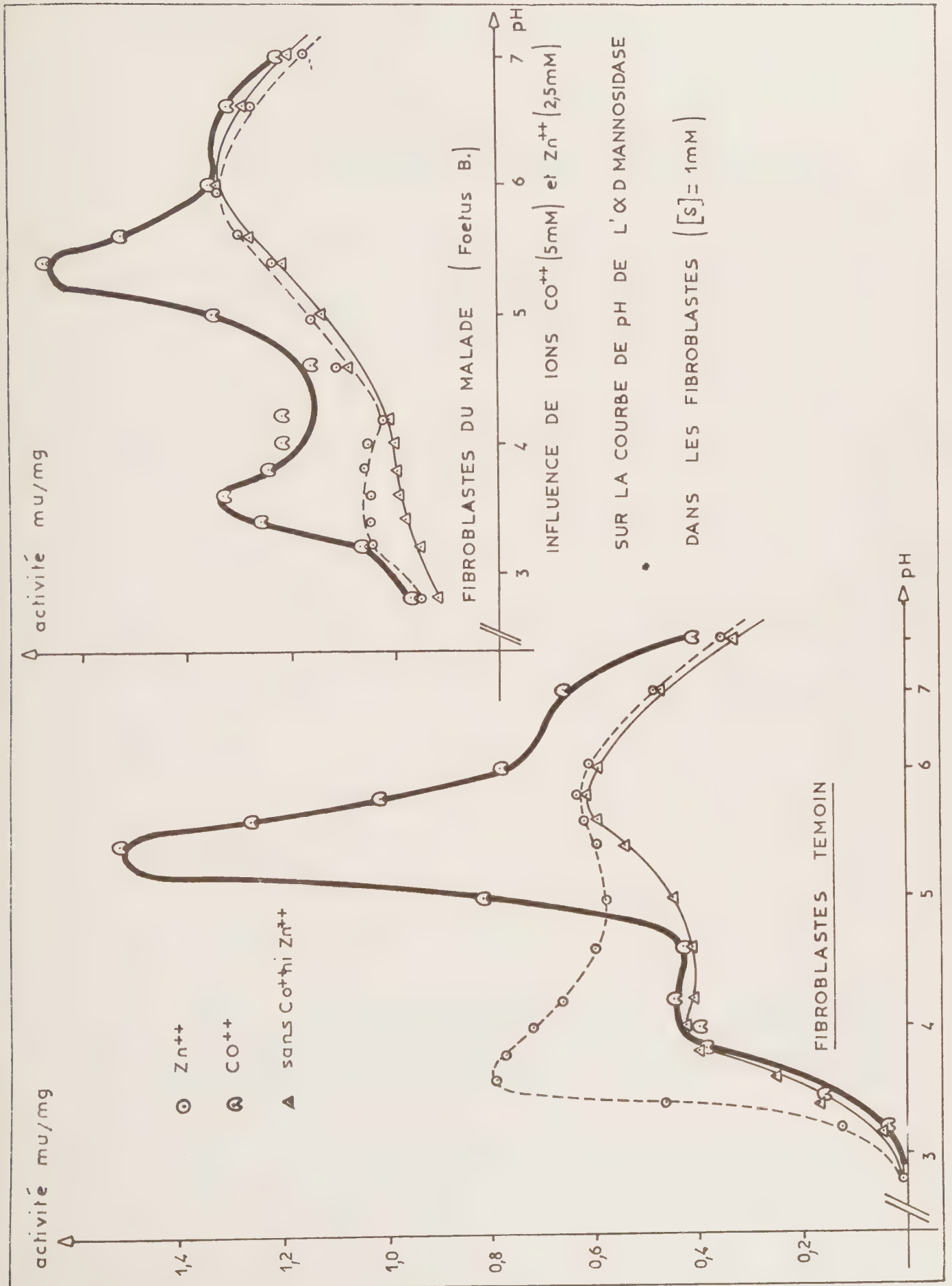
d) Influence de la température

- à 60° C

Deux culots de fibroblastes d'un témoin et de Saliha ont été repris dans du tampon citrate phosphate de Mac-Ilvaine dilué au 1/10 à pH 7, lysés et centrifugés à 10.000 g puis inactivés à 60° C. Les aliquots ont été prélevés à 5, 10, 20, 40 et 60 minutes pour détermination de l'activité enzymatique.



FIGURE 17





A partir de 5, 10 minutes, jusqu'à une heure, nous avons retrouvé :

- . 0 % d'activité résiduelle chez Saliha B. à pH 4 et à pH 5
- . 80 % d'activité résiduelle chez le témoin à pH 4
- . et 30 - 35 % d'activité résiduelle chez le témoin à pH 5.

L'activité acide normale est donc extrêmement thermostable, car l'étude de l'influence du pH montre qu'à pH 4, les 20 % perdus doivent correspondre à une inactivation de l'activité résiduelle de la forme plus neutre à ce pH ; la forme moins acide par contre, se révèle sensible à l'action de la chaleur.

Chez Saliha, toute l'activité est sensible à l'action de la température. Comme nous avons pu montrer qu'il existe néanmoins une forme acide, c'est que sa stabilité est bien inférieure à celle de la forme acide normale.

- A 50° C

L'inactivation a été conduite de la même façon, et des aliquots ont été prélevés à 10, 30, 60, 120 et 180 minutes.

A pH 4, entre une et trois heures, nous avons trouvé une activité résiduelle de :

- . 100 % chez le témoin,
- . 75 % chez le père et la mère
- . 58 % chez Saliha.

- A 45° C

Une inactivation des fibroblastes du foetus B. et de fibroblastes d'un foetus témoin, a été conduite par erreur sur les homogénats repris par du sérum physiologique à 45 ° C. L'étude de l'influence du pH a donné les résultats suivants :

Fibroblastes du foetus B. après 1 heure d'inactivation à 45° C : pH 3,8 = 143 %
pH 5,8 = 51 %



Fibroblastes du foetus témoin après une heure d'inactivation à 45° C

pH 3,8 = 147 %

pH 5,8 = 68 %

Il apparait donc que la forme acide n'a pas été inactivée mais au contraire a été stimulée après 1 heure d'incubation à 45° C en milieu protéique.

e) électrophorèse

Une électrophorèse a été réalisée sur acétate de cellulose de la façon suivante :

- . Des bandes de cellogel 17 x 2,5 cm ont été employées.
- . La migration a été pratiquée en tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 5,5 (au lieu de 6,5 dans la technique de POENARU) à 220 Volts en appliquant 4 mA par bande pendant 2 heures 30.

La révélation a été faite à l'aide d'une bande de papier filtre imprégnée d'une solution 5 mM de 4 methylumbelliferyl alpha D mannopyranoside dans du tampon citrate de sodium 0,2 M à pH 5, laissée en contact pendant 3/4 d'heure à 37° C ; et la fluorescence a été activée par exposition aux vapeurs d'ammoniac.

La photo 3. présente le résultat obtenu : elle permet d'objectiver à la fois :

- . la bande d'activité acide la moins anodique
- . et la bande d'activité plus neutre plus anodique

L'utilisation d'une forte concentration en substrat permet de faire apparaitre la bande d'activité acide chez la malade (Saliha B.). Cette bande d'activité acide ne présente pas de différence de migration électrophorétique avec celle du témoin.

II.5. ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE SECRETEE DANS LE MILIEU DE CULTURE DES fibroblastes

Essai 1 :

Le milieu de culture sans sérum de veau fœtal est recueilli et concentré 25 fois tandis que les cellules sont récoltées classiquement par trypsination afin d'y déterminer l'activité enzymatique et le taux global de protéine.

Les taux globaux de protéines cellulaires pour les fibroblastes étudiés de Saliha et du témoin sont du même ordre, et l'activité sécrétée dans le milieu de culture de ces fibroblastes, pour une concentration en substrat de 1 mM à pH 3,8 est :

- . pour le témoin de 51 microunités / ml,
- . pour Saliha de 50 microunités / ml.

L'activité dans les mêmes conditions mais en présence d'ions Zn^{++} ($Zn SO_4$ 1 mM) est :

- . pour le témoin de 89 microunités / ml,
- . pour Saliha de 105 microunités / ml.

L'étude de l'influence de la concentration en substrat à pH 3,8 a montré une cinétique michaelienne pour l'enzyme sécrétée par les fibroblastes normaux comme par les fibroblastes de Saliha ; la représentation de Lineweaver et Burk a permis de mesurer une K_m analogue dans les 2 cas ; les ions Zn^{++} à la concentration de 1 mM diminuaient la K_m dans les mêmes proportions dans les 2 cas.

	: K_m à pH 3,8	: K_m à pH 3,8 en	:
	:	: présence de Zn^{++}	:
	:	: 1 mM	:
: Témoin	: 0,92 mM	: 0,69 mM	:
: Saliha B.	: 0,90 mM	: 0,68 mM	:

Essai 2 :

Le recueil du milieu et des cellules est effectué comme dans l'essai 1, mais le milieu a été concentré 45 fois.

Le taux global de protéines cellulaires dans le falcon du foetus B. est environ 2 fois plus faible que dans le falcon du témoin et l'activité secretée mesurée à pH 3,8 pour une concentration en substrat de 1 mM est pour le témoin de 22 microunités / ml, pour le foetus B. de 7 microunités / ml.

L'étude de l'influence de la concentration en substrat à pH 3,8 a là encore, mis en évidence une cinétique Michaelienne dans les 2 cas, et l'influence des ions Zn^{++} 1 mM et Co^{++} 5 mM s'est révélée identique dans les 2 cas.

:	:	:	:	:
:	: sans Co^{++}	: en présence de:	en présence :	:
:	: ni Zn^{++}	: Zn^{++} 1 mM	: Co^{++} 5 mM	:
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
: Témoin - Km	: 0,71 mM	: 0,63 mM	: 1,56 mM	:
: - vitesse maximale	: 41 $\mu u/ml$	: 51 $\mu u/ml$	: 39 $\mu u/ml$	:
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
: Foetus B. - Km	: 0,69 mM	: 0,61 mM	: 1,85 mM	:
: - vitesse maximale:	: 10 $\mu u/ml$	: 14 $\mu u/ml$	: 8 $\mu u/ml$	:
:	:	:	:	:

Il ressort de ces 2 essais que les enzymes sécrétés par les fibroblastes normaux et les fibroblastes pathologiques paraissent très analogues.

La seule différence que nous ayons pu objectiver concerne l'action du mannose qui mérite d'être étudiée plus précisément (1 seul essai ayant pu être effectué et avec une quantité de matériel réduite). La figure 18 montre néanmoins que l'enzyme sécrétée par les fibroblastes pathologiques est moins sensible à l'inhibition par le mannose et que, de façon très anormale, cette enzyme est plus sensible à l'action du mannose à une concentration plus élevée en substrat. Cette étude préliminaire nous paraît intéressante et sera reprise dans un travail ultérieur.

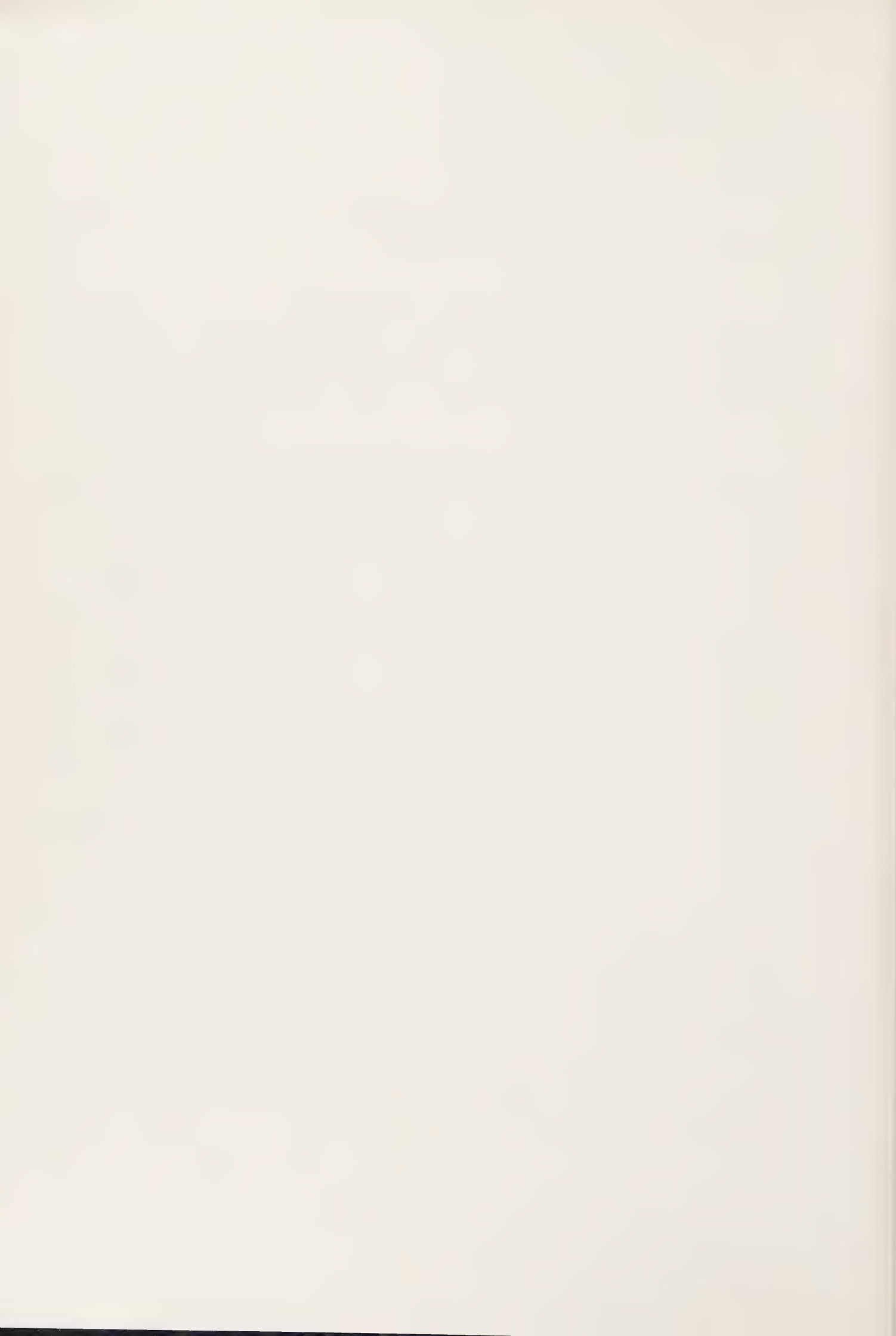
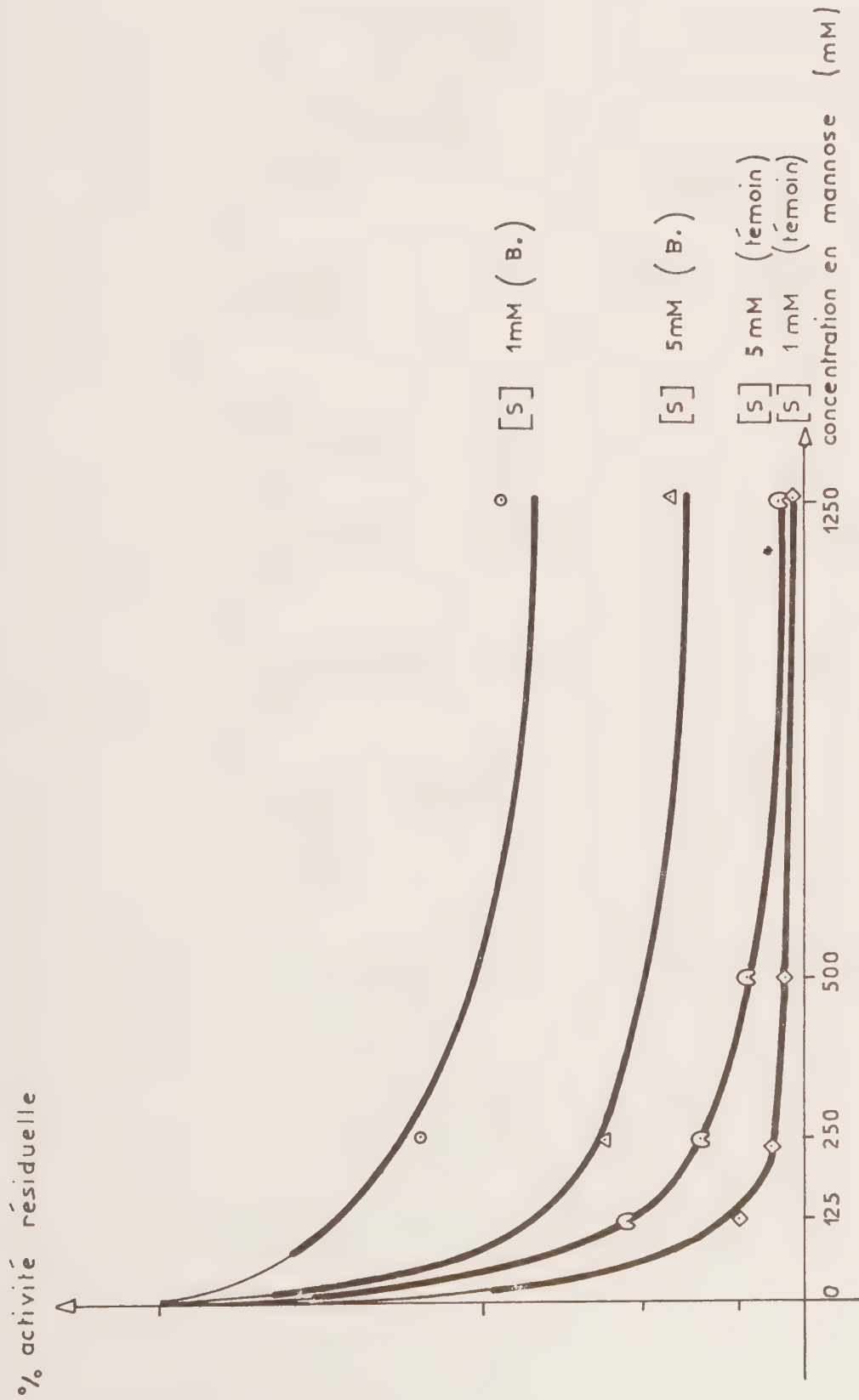


FIGURE 18



INFLUENCE DU MANNOSE SUR L'OXYD MANNOSIDASE SECRÉTÉE DANS LE MILIEU DE CULTURE

DES FIBROBLASTES ($[S] = 1 \text{ ou } 5 \text{ mM} - \text{pH } 3,8$)



II.6. - DIAGNOSTIC PRENATAL : Etude de l'alpha D mannosidase dans le liquide et les cellules amniotiques cultivées.

Le diagnostic prénatal de la mannosidose n'avait jamais été réalisé avant notre étude ; les anomalies enzymatiques que nous avons pu mettre en évidence dans les divers milieux biologiques de nos malades, et en particulier dans les fibroblastes cutanés, nous ont autorisé à proposer un diagnostic prénatal dans cette famille alors qu'une nouvelle grossesse était en cours.

Notre étude a porté sur le liquide amniotique et sur les cellules amniotiques cultivées.

a) le liquide amniotique

La figure 19 montre à l'évidence que ce milieu est défavorable à cause de l'importante activité intermédiaire et de la très faible activité acide chez les témoins.

Malgré un rapport des activités pH 3,5 / pH 4,5 différent chez Madame B.,

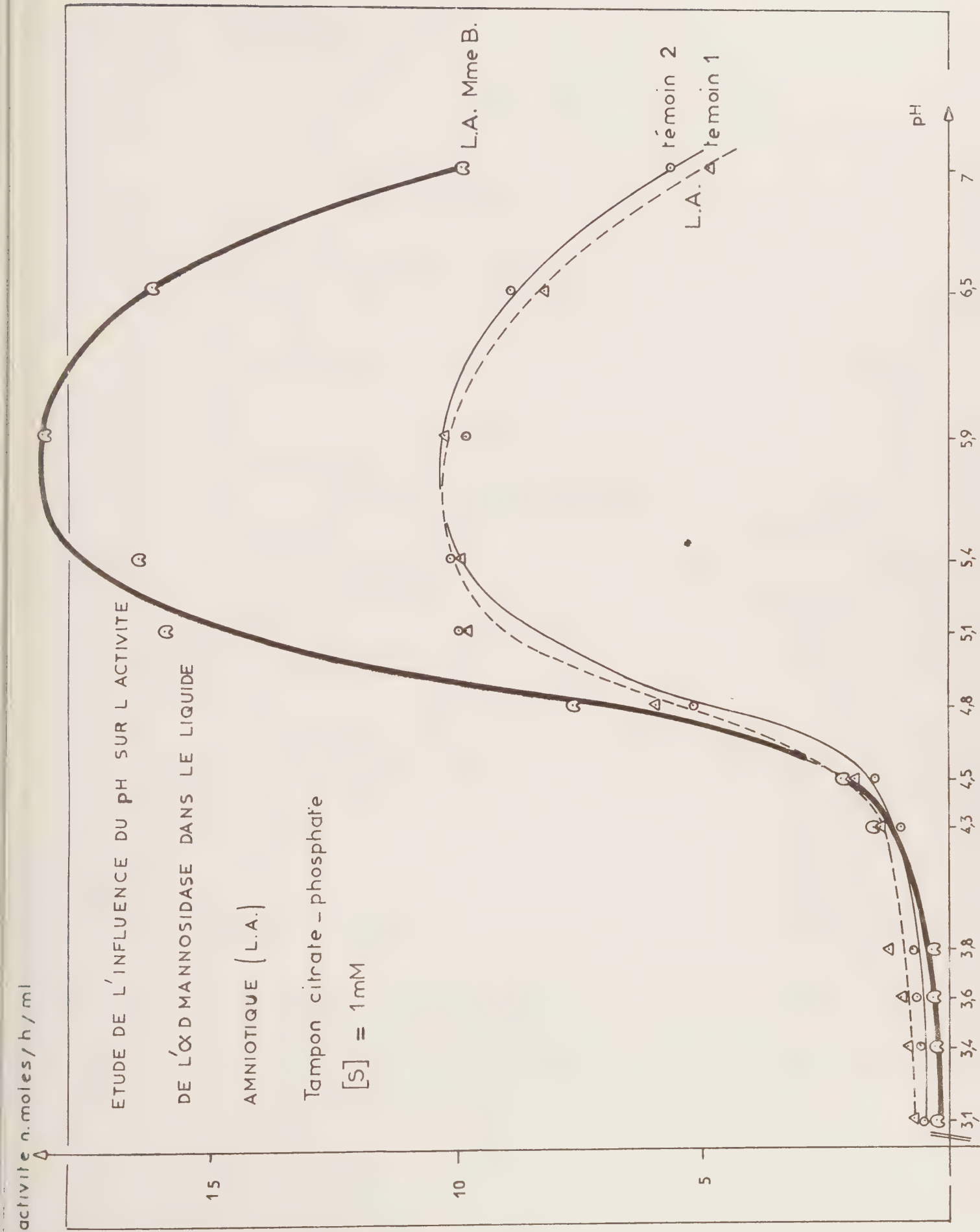
. Madame B.	0,090
. Témoins 1	0,410
. Témoin 2	0,344

l'absence presque totale d'alpha D mannosidase à pH 3,5 dans certains liquides amniotiques de contrôle ôte tout espoir d'utiliser le liquide amniotique pour le diagnostic prénatal.

b) les cellules amniotiques cultivées

Nous avons contrôlé la viabilité cellulaire par l'étude de la beta galactosidase et de l'alpha L fucosidase.







Bêta galactosidase Mme B. - essai 1 = 9,0 mu/mg

- essai 2 = 5,0 mu/mg

Témoins (25) moyenne 11,3 mu/mg

valeurs extrêmes 3,9 à 22 mu/mg

Alpha L fucosidase Mme B. - essai 1 = 2,26 mu/mg

Témoins (4) = 1,5 à 2 mu/mg

Nous n'avons pu constaté aucune corrélation entre l'activité de l'alpha D mannosidase et de la Beta galactosidase chez les témoins.

L'alpha mannosidase des cellules amniotiques est rapportée dans le tableau 15 :

TABLEAU 15

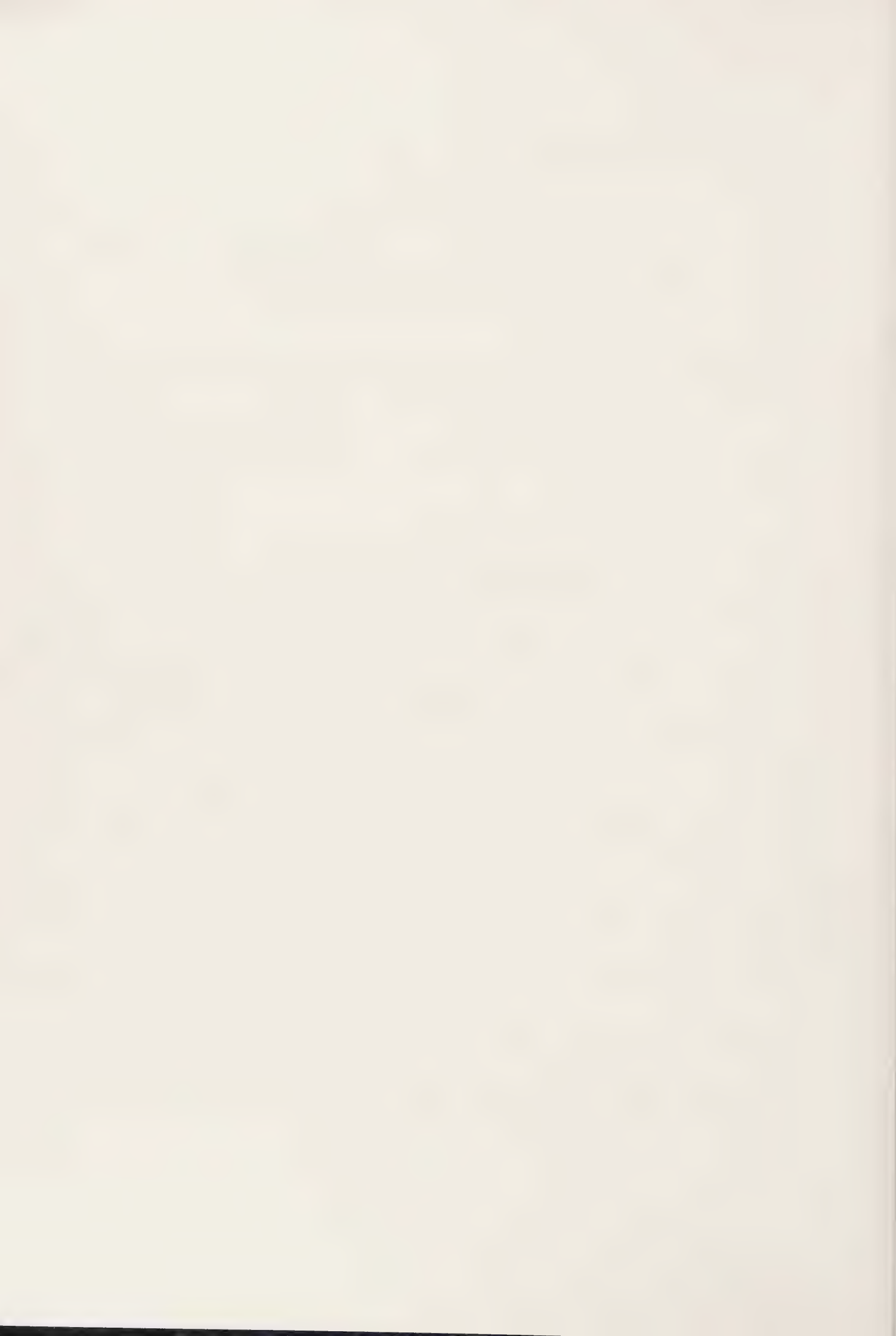
Activité de l'alpha D mannosidase dans les
cellules amniotiques en culture

	Alpha D mannosidase (S) 7,8 mM			alpha D mannosidase (S) 1 mM			Man 10mM	Man 1 mM
	pH 3,8	pH 5,7	Man pH 3,8 Man pH 5,7	pH 3,8	pH 5,6	Man pH 3,8 Man pH 5,6	pH 3,8	
Témoins **								
Nombre	17	17	17	7	7	7	7	
Moyenne	1,08	0,90	1,3	0,9	0,43	2,9	2,0	
valeurs extrêmes	0,28-3,0	0,21-1,6	0,68-2,3	0,54-1,7	0,12-0,64	1,8-7,0	1,7-2,2	
Mme B.								
Essai 1 (culture primaire)	0,47	1,23	0,38	0,093	0,25	0,37	5,0	
Essai 2 (subculture 1)	0,30	-	-	0,10-0,065	0,32	0,26	3,6	

(Les activités enzymatiques sont données en milliunités par mg de protéines).

★★ cellules amniotiques en culture primaire ou en subculture 1

* 1 seul témoin a donné un taux aussi faible et refait en subculture 1,
il a présenté une activité de 0,80 mu/mg



Le tableau 15 montre la nécessité de travailler à faible concentration en substrat. Il montre aussi tout l'intérêt de mettre en évidence des anomalies qualitatives de l'enzyme dans les cellules amniotiques où l'activité est extrêmement variable. (cf. les valeurs extrêmes des témoins) :

- l'influence du pH (figure 20) à faible concentration en substrat est tout à fait caractéristique de la maladie (le rapport des activités à pH 3,8 / 5,8 reflète cette influence).

- l'influence de la concentration en substrat à pH 3,6 met en évidence l'altération de l'affinité de l'enzyme mutante (figure 21) pour le substrat MU.

La miniaturisation des méthodes que nous avons mises au point (cf figure 9), permet l'étude de ces paramètres sur de faibles quantités de cellules.

c) Contrôle du diagnostic sur les fibroblastes du fœtus

Le diagnostic a été contrôlé sur les divers organes et sur les fibroblastes cutanés fœtaux. Nous ne rapportons dans ce chapitre que l'étude des fibroblastes.

Fibroblastes du fœtus B

Activité de l'alpha D mannosidase à diverses subcultures pour une concentration en substrat de 1 mM (activité en mu/mg de protéine)

<u>pH 3,8</u>		<u>pH 5,8</u>	
Sub 1	0,029	0,19	
Sub 5	0,060	0,45	} Témoins 0,4 à 1,0
Sub 7	0,020	0,20	
} Témoins 0,3 à 1,5			

Influence de la concentration en substrat

<u>Fœtus B</u>	<u>Fœtus Témoin</u>
pH 3,8 cinétique non Michaelienne (S) 6 à 25 mM $K'_m = 30\text{mM}$	1,02 mM
pH 5,8 1,38 mM	1,25 mM

influence du pH

Effondrement de l'activité à pH 3,8 chez le fœtus



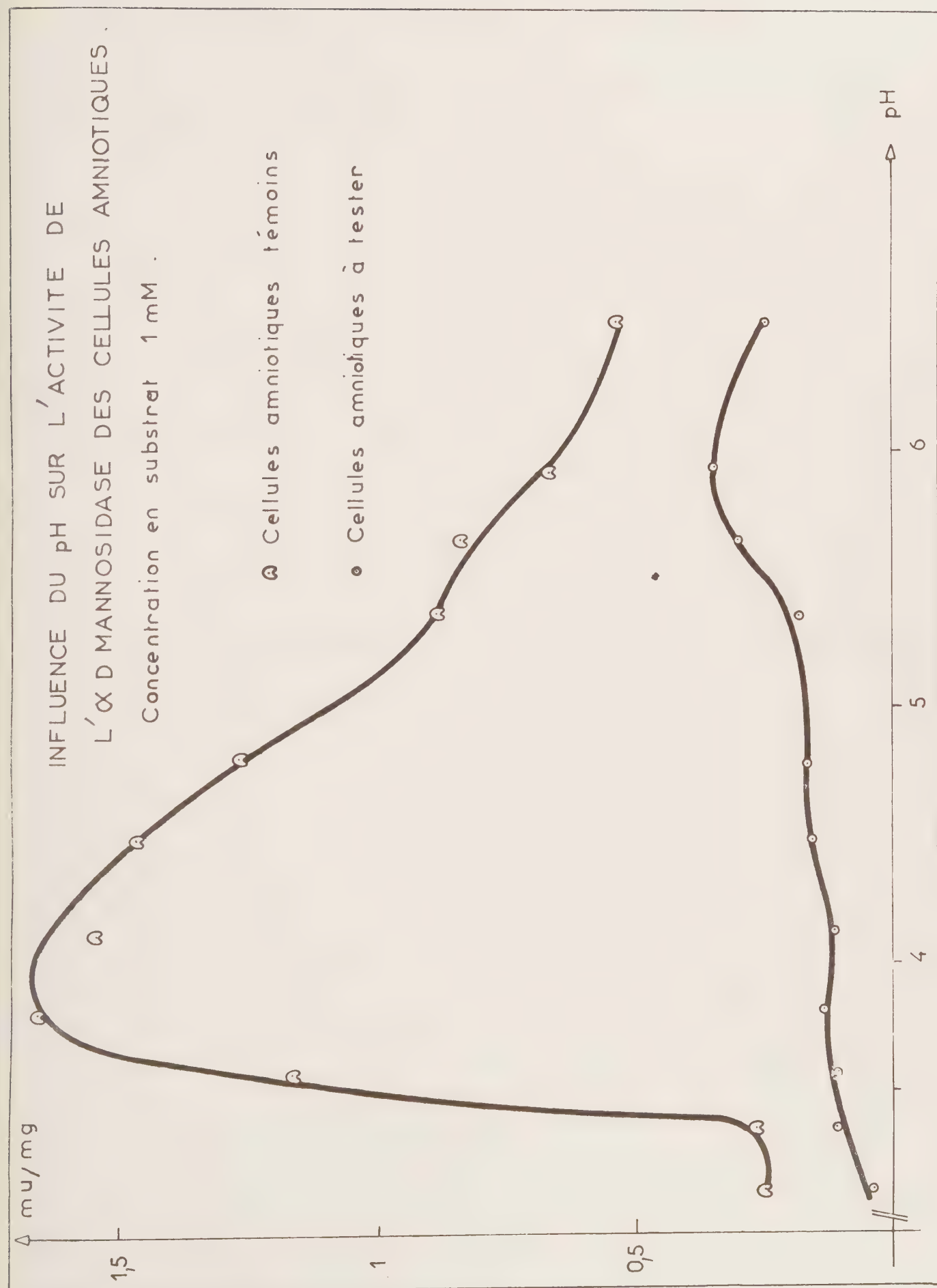
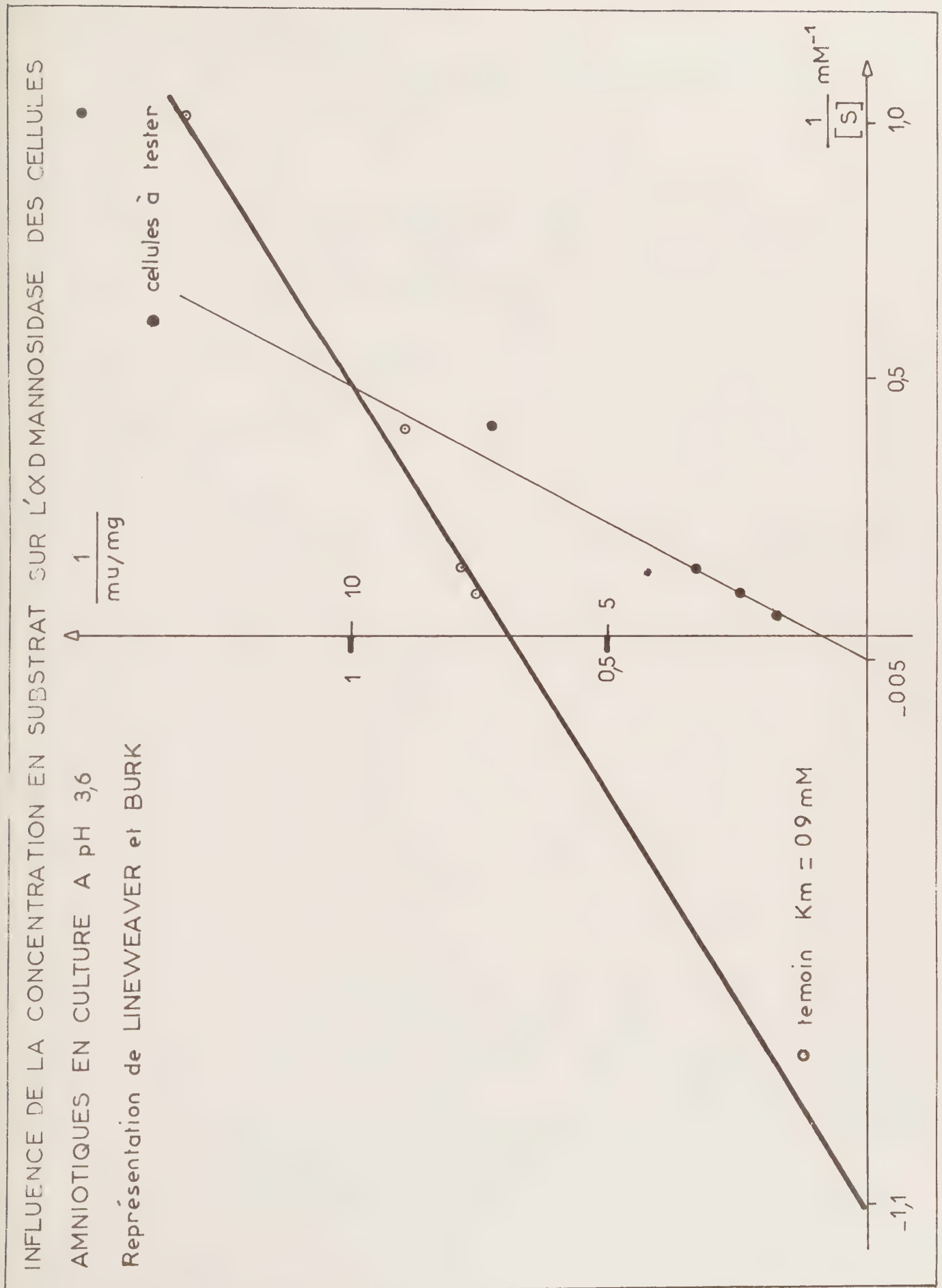




FIGURE 21



Influence des effecteurs

A pH 3,8, pour une faible concentration en substrat (1mM), le cobalt 5 mM active plus l'alpha D mannosidase que le zinc 2,5 mM.

II.7. - ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE ACIDE PLACENTAIRE

a) l'enzyme placentaire normale

- Essai de purification :

Matériel et réactif :

Matériel

- . homogénéiseur : mixer à couteaux (Intern. Lab. Dottingen représenté par Roucaire - France), type ILA CX (Puissance 260 Watts, vitesse 25.000 à 30.000 tours par minute).
- . centrifugeuse : ultracentrifugeuse réfrigérée MSE Superspeed 65
- . armoire à froid LKB 5201 Combi Cold Rac
- . Uvicord II LKB 8300
- . Collecteur de fractions LKB
- ..Colonnes de verre :
 - 1 colonne hauteur 85 cm diamètre 5 cm
 - 1 colonne hauteur 50 cm diamètre 2,5 cm
 - 1 colonne hauteur 1 m. diamètre 2,5 cm.
- . pompes péristaltiques LKB 12.000 varioperpex
- . 1 appareil à gradient automatique LKB Ultrograd 11.300
- . 1 enregistreur LKB 6500
- . 1 chambre d'ultrafiltration Diaflo (Amicon) avec membrane XM 50 branchée sur une bouteille d'azote
- . Résine Sephadex G 150 qualité superfine (Pharmacia Fine Chemicals)
G 200 " " (Pharmacia Fine Chemicals)
- . Résine échangeuse d'ions DE 52 microgranulaire prégonflée (Whatman)
- . Spectrofluorimètre Aminco-Bowman
- . Spectrophotomètre Gilford 240

Réactifs

- . Sulfate d'ammonium (Sigma ou Merck)
 - . Tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6 (phosphates mono et disodique Merck)
 - . Chlorure de sodium (Merck)
 - . 4 methylumbelliféryl alpha D mannopyranoside (Koch Light)
- Pour les contaminants recherchés :
- 4 methylumbelliféryl Beta D glucopyranoside
 - 4 methylumbelliféryl Beta D galactopyranoside,
 - 4 methylumbelliféryl 2 acetamido 2 déoxyBeta D glucopyranoside,
 - 4 methylumbelliféryl alpha D galactopyranoside,
 - 4 methylumbelliféryl Beta D glucuronide trihydrate (Koch Light),
 - p. nitro-catechol sulfate (Sigma)
- . Sulfate de zinc ZnSO₄, Nitrate de cobalt Co(NO₃)₂, mannose (Merck)

Méthode :

C'est une variante de la méthode de PHILIPPS (244).

1° Lavage du placenta

2 kg environ de placentas conservés congelés à -80° C sont mis à décongeler dans une solution de chlorure de sodium isotonique. Le placenta décongelé est découpé aux ciseaux en enlevant le maximum de membranes et de vaisseaux.

Les lavages successifs se font dans de grands volumes de sérum physiologique refroidi à + 4° C jusqu'à obtention d'eaux de lavage non colorées (pour avoir un minimum d'hémoglobine qui risquerait de colmater les colonnes).

2° Homogénéisation et centrifugation

Le placenta en morceaux est essoré dans un linge, pesé (environ 600 g) et additionné d'eau bidistillée (sur la base de 1Kg d'organe lavé et débarassé de ses membranes pour 4 litres d'eau bidistillée). L'homogénéisation est commencée au mixer à couteaux grossier puis poursuivie par fractions à l'aide de l'appareil ILA CX en maintenant le mélange dans un bac à glace. = fraction I
(Il convient de remarquer que, en dépit des précautions de refroidissement, l'alpha D mannosidase C thermolabile est généralement en grande partie inactivée au cours de ces opérations).

Cet homogénat est alors centrifugé 30 minutes à + 4° C à 25.000 g et le surnageant est récupéré = fraction II. Le passage de l'enzyme dans l'eau se fait très bien sans la moindre adjonction de détergent et le rendement de cette étape se situe entre 85 et 98 %.

3° Première précipitation au sulfate d'ammonium :

Le sulfate d'ammonium solide (500 g/l) est ajouté très lentement et on laisse précipiter le mélange une nuit à + 4° C. On centrifuge alors 20 à 30 minutes à 25.000 g à + 4° C et le précipité obtenu est redissout dans 1 litre de tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6 : fraction III

4° Inactivation thermique de la mannosidase neutre :

La fraction III est placée au bain marie à 45° C pendant 1 heure sous agitation, puis centrifugée 20 à 30 minutes à 25.000 g à + 4° C et le surnageant est récupéré = fraction IV

5° Deuxième précipitation au sulfate d'ammonium :

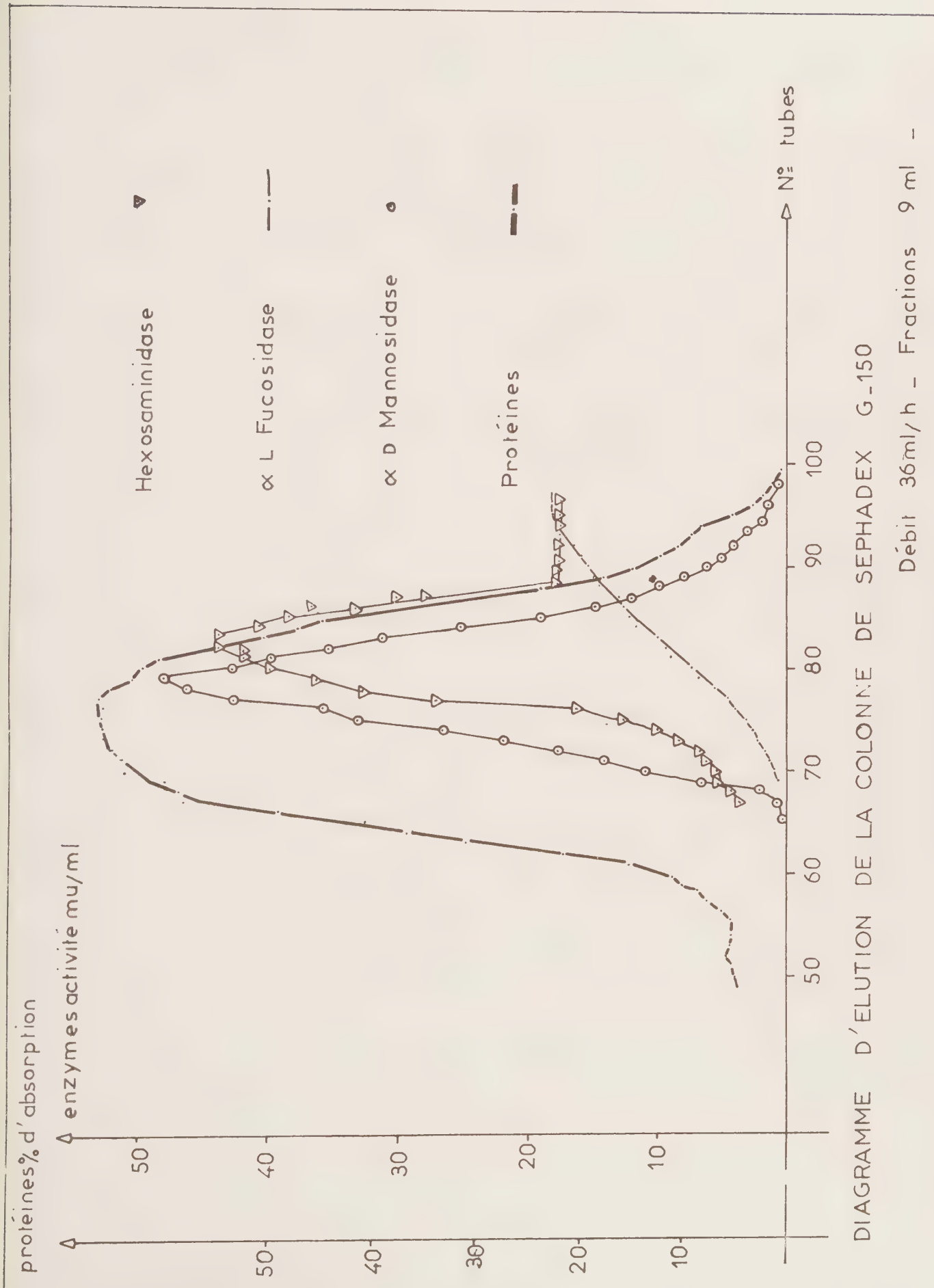
Après addition très lente de 600 g par litre de sulfate d'ammonium cristallisé à la fraction IV, la précipitation s'effectue pendant une nuit ; le mélange est alors centrifugé 20 à 30 minutes à 25.000 g à + 4° C. Le précipité séparé est redissout dans du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6 ; le mélange est concentré sur membrane Diaflo XM 50 avant d'être déposé sur la colonne de chromatographie sous un volume adapté (50 à 80 ml). = Fraction V

6° Passage sur une colonne de Sephadex G.150

(longueur 85 cm - diamètre 5 cm)). L'échantillon est introduit très lentement à l'aide de la pompe à la surface supérieure du gel qui a été préalablement équilibré avec du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6, qui servira à l'élution : ce tampon est appliqué sur la colonne à l'aide d'une pompe à débit variable de façon à instaurer un débit de 36 ml par heure. Le collecteur de fraction est réglé de telle sorte que les fractions récoltées soient de 9 ml.

Sur chaque fraction l'activité de l'alpha D mannosidase est déterminée à pH acide (3,8) et pour une concentration en substrat de 1 mM ; les protéines sont dosées automatiquement car, avant d'être collecté, l'éluat passe à travers l'Uvicord relié à un enregistreur qui note l'absorption à 280 nm. Sur les fractions qui contiennent de l'alpha D mannosidase, l'activité de l'hexosaminidase

FIGURE 22



et l'activité de l'alpha L fucosidase sont mesurées (ces deux enzymes constituent en effet les contaminants principaux de la mannosidase au stade final).

Au cours des 4 essais réalisés, l'enzyme est "sortie" à peu près régulièrement entre le tube 60 et le tube 95 (c'est à dire après le passage d'environ 540 ml de tampon d'élution). Au cours de l'essai présenté ici (figure 22), les tubes 69 à 88 inclus ont été conservés.

La figure 22 présente le pic d'alpha mannosidase et les pics des 2 principaux contaminants : l'alpha L fucosidase et l'hexosaminidase.

Le contenu des tubes 69 à 88 est rassemblé et concentré sur membrane Diaflo XM 50 jusqu'à un volume de 8 ml = Fraction VI.

7° Passage sur colonne de DE 52

(longueur 50 cm - diamètre 2,5 cm). La fraction VI est lentement introduite sur la colonne grâce à la pompe qui est ensuite réglée pour l'obtention d'un débit d'élution de 36 ml par heure. Le collecteur de fractions recueille des volumes de 4,5 ml par tube.

L'élution dure 16 heures et est réalisée à l'aide de :

- . tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6 pendant 4 heures.
- . puis d'un gradient linéaire de chlorure de sodium de 0 à 0,3 M dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6 pendant 12 Heures.
- . Cette opération est automatiquement programmée (Ultrograd 11300)

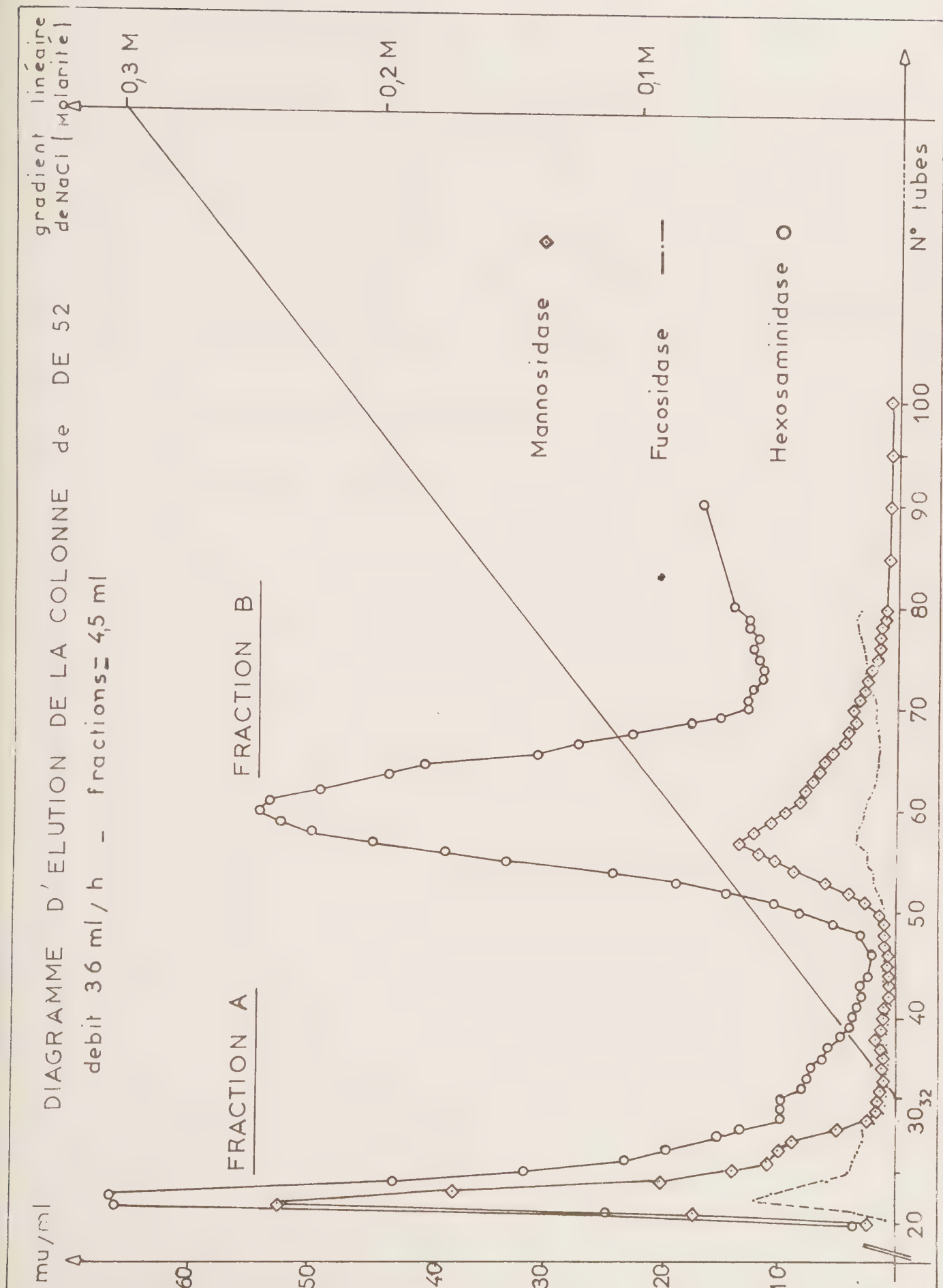
Deux pics sont obtenus (figure 23).

une fraction A éluee sans chlorure de sodium

une fraction B éluee en présence de chlorure de sodium 0,08 à 0,1 M selon les essais.

La fraction A et la fraction B sont concentrées séparément sur membrane Diaflo XM 50, la première à 6 ml et la seconde à 8 ml, puis passées à tour de rôle sur la colonne de Sephadex G 200.

FIGURE 23



8° Passage sur colonne de Sephadex G 200 (hauteur 1 mètre - diamètre 2,5 cm).

Cette résine nous a posé des problèmes de colmatage entraînant des débits moins réguliers et faibles (de l'ordre de 9 ml/heure). Les fractions recueillies sont ici de 3,6 ml et les figures 24 et 25 montrent le pic d'élution de l'enzyme. La fraction A est ressortie très peu contaminée. Par contre, la fraction B est davantage contaminée par l'hexosaminidase et par la fucosidase : nous avons donc recueilli une fraction B1 (tubes 39 à 44 inclus), plus pure et une fraction B2 (tubes 45 à 51 inclus) plus contaminée. En fait il est possible de se débarrasser de l'alpha L fucosidase en la retenant par chromatographie d'affinité sur Agarose ξ -amino caproyl fucosamine (Miles - Yeda).

Résultats de cette purification

Ils sont résumés dans le tableau 16.

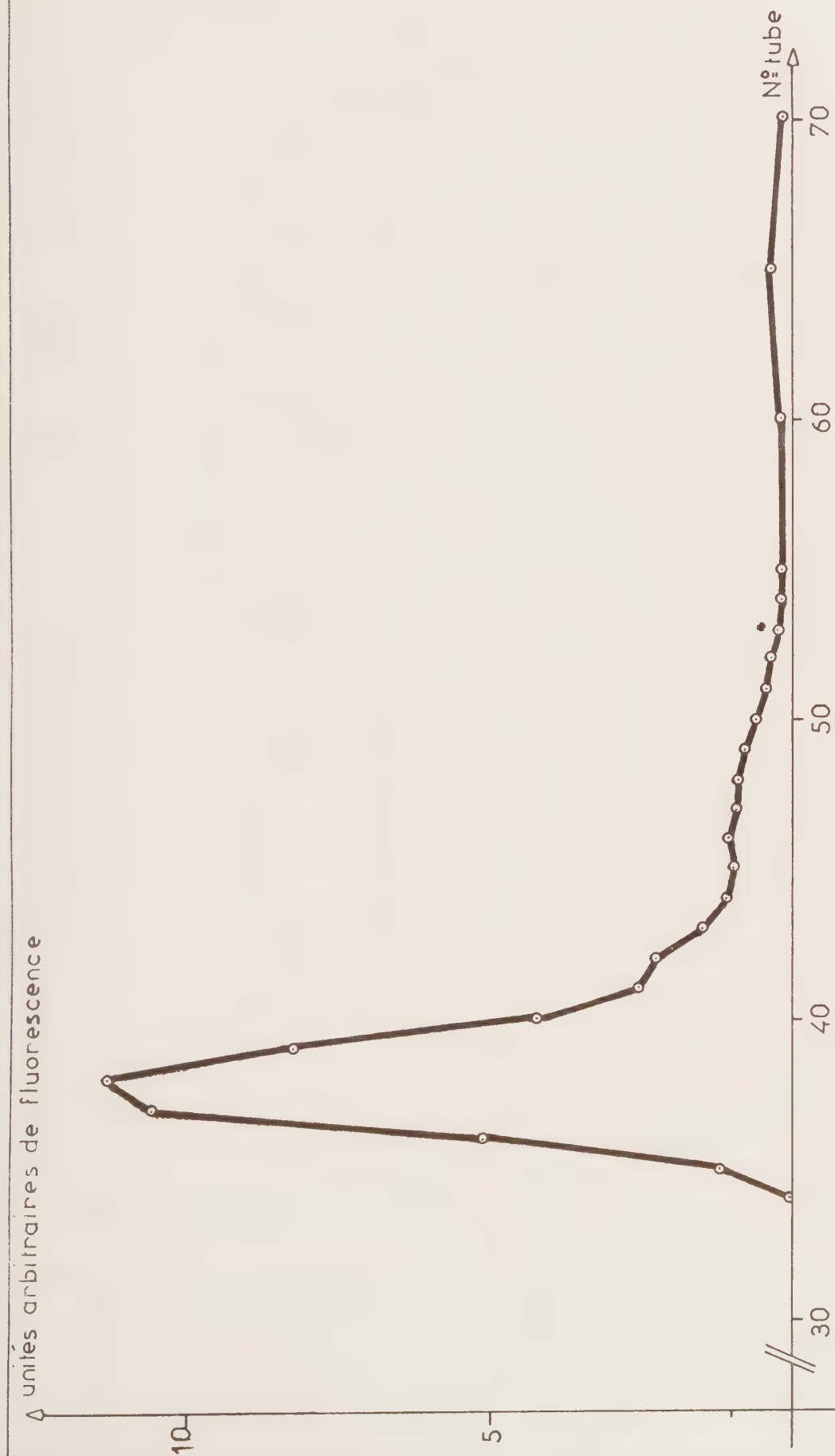


DIAGRAMME D'ELUTION DE LA FRACTION A APRES PASSAGE SUR COLONNE DE

SEPHADEX G-200 - Débit ≈ 10 ml/h - Fractions = 3,6 ml.

FIGURE 25

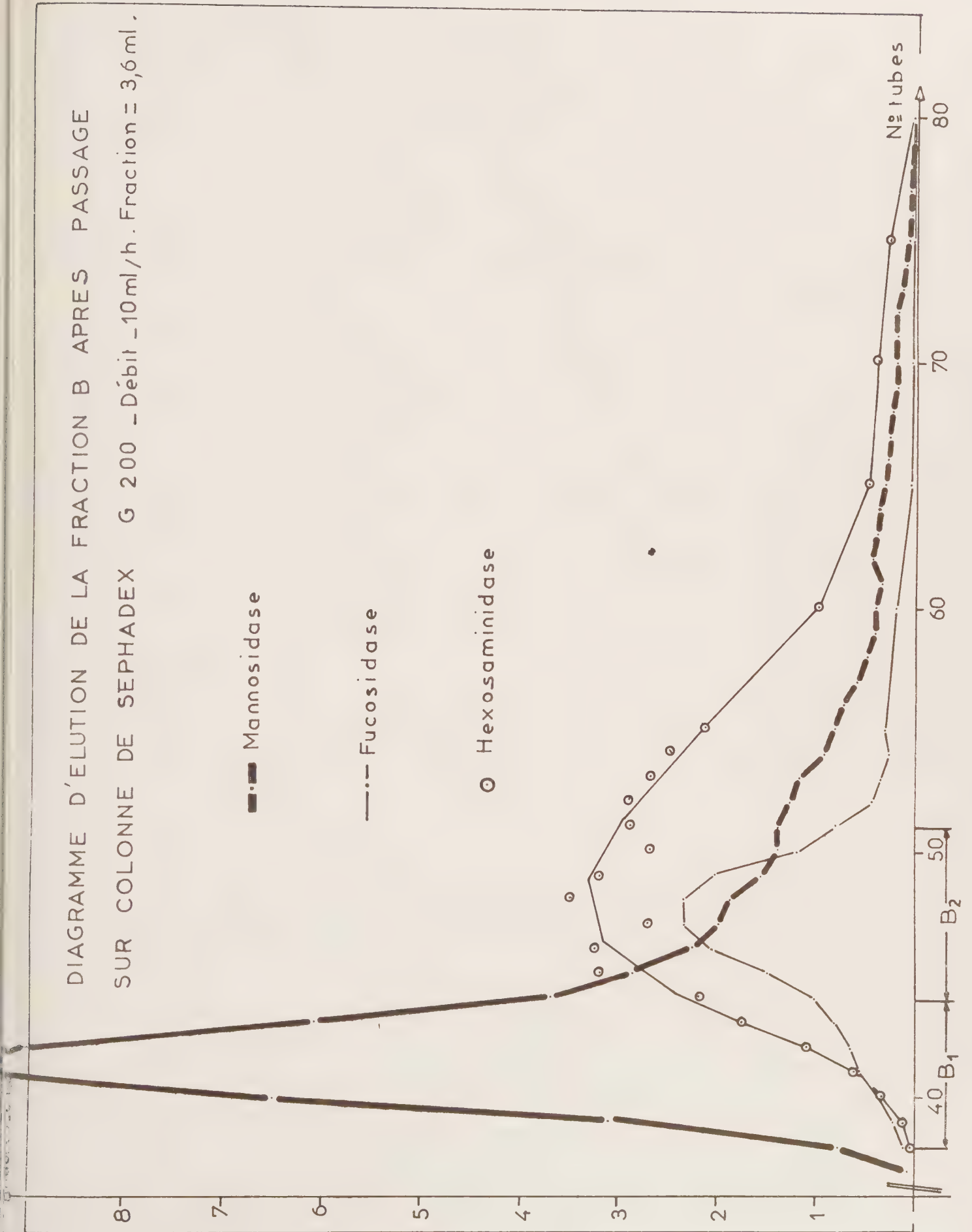


TABLEAU 16

RESULTATS DE LA PURIFICATION DE L'ALPHA D MANNOSIDASE
PLACENTAIRE NORMALE

Fractions N°	II	VI après (Sephadex: G 150)	A (après DE 52)	B	A (après Sephadex G 200)	B1	B2
Volume total ml	2.300	180	49,5	112,5	43,2	21,6 (tubes 39 44)	25,2 tubes 45- 51
Activité totale mU	12236	4829	815,5	713,3	165	123,4	48,2
Rendement	100	39,5	12,5 %		2,75 %		
Activité spécifique mu/mg protéine	9,0	45,0	1117,3	160,5	2325	339	197
Purification	1,0	x 5	x 124	x 28,9	x 258	x 37,7	x 21,9
Contaminants principaux (en % de l'activité de la mannosidase) Hexo- saminidase.	655 %	155 %	122 %	300 %	1,0 %	13 %	89 %
Alpha L fucosidase	211 %	22 %	27 %	15 %	0,97 %	8 %	57 %

Les autres contaminants Beta galactosidase, alpha galactosidase, Beta glucuronidase, Beta glucoside et arylsulfatase A sont beaucoup moins problématiques et perdus assez rapidement au cours des premières opérations.

Au total, il s'agit d'une technique lourde d'assez mauvais rendement et où la contamination par l'hexosaminidase et la fucosidase reste un problème imparfaitement résolu. Le mauvais rendement est encore plus apparent du fait de la longueur des opérations car, si l'alpha D mannosidase acide à pH 6 ou 7 est très stable jusqu'en fraction V, sa stabilité diminue très rapidement au delà de ce stade. Les techniques par chromatographie d'affinité publiées ultérieurement par ROBINSON (259) nous paraissent beaucoup plus séduisantes.

Mais nous avons redouté qu'elles nous posent plus de problèmes pour l'étude de l'enzyme pathologique dont les propriétés d'affinité risquent d'être altérées.

- Propriétés de l'homogénat et des fractions purifiées (Formes acides)

Influence du pH

L'homogénat initial présente 2 pics d'activité en tampon citrate-phosphate :

- . l'un à pH 3,8 - 4,
- . l'autre à pH voisin de 6.

Il semble que dans l'homogénat il existe un facteur stabilisant la mannosidase à pH inférieur à 3,8 (pH optimal) comme le suggèrent les résultats du tableau suivant :

:	:	:	:
:	:	Rapport des activités à 2pH :	
:	:	:	:
:	Fraction	:	:
:	:	man 2,6	man 3,0
:	:	man 3,8	man 3,8
:	:	:	:
:	Fraction II	0,77	0,93
:	(homogénat)	:	:
:	:	:	:
:	Fraction III	0,012	0,14
:	(1er stade de	:	:
:	purification)	:	:
:	:	:	:

La fraction A et la fraction B ont un pH optimal en tampon citrate (0,1 M) phosphate (0,2 M) de 4 à 4,2 selon les essais.

Influence de la concentration en substrat MU

L'homogénat comme les fractions purifiées A et B suivent une cinétique michaelienne ; toutefois, le substrat à concentration supérieure à 2,5 - 3 mM devient inhibiteur si bien que la vitesse maximale n'est pas atteinte et peut

être seulement déduite de la représentation de Lineweaver et Burk.

Pour l'homogénat $K_m = 1,5 - 1,6 - 1,6$ mM lors des différents essais

Pour la fraction A purifiée $K_m = 1,9 - 1,8 - 2,0 - 2,0$ mM

Pour la fraction B purifiée $K_m = 2,0 - 1,8 - 1,7 - 2,0$ mM

La vitesse maximale déterminée lors de la purification la plus poussée (tableau 16) a été pour A de 7140 $\mu\text{u}/\text{mg}$ de protéine, et pour B de 1050 $\mu\text{u}/\text{mg}$ de protéines.

La détermination du n de Hill (comme pente de la droite :

$$\frac{\log v}{v_{\max} - v} = f(\log(s))$$

donne une valeur de n voisine de 1 pour la fraction A (figure 26) comme pour la fraction B. La partie non linéaire du graphique à forte concentration du substrat correspond à la zone d'inhibition par le substrat (et n va tendre vers - 1). L'enzyme normale possède donc 1 seul site enzymatique ou plus probablement plusieurs sites de même affinité pour le substrat et n'interagissant pas entre eux (268).

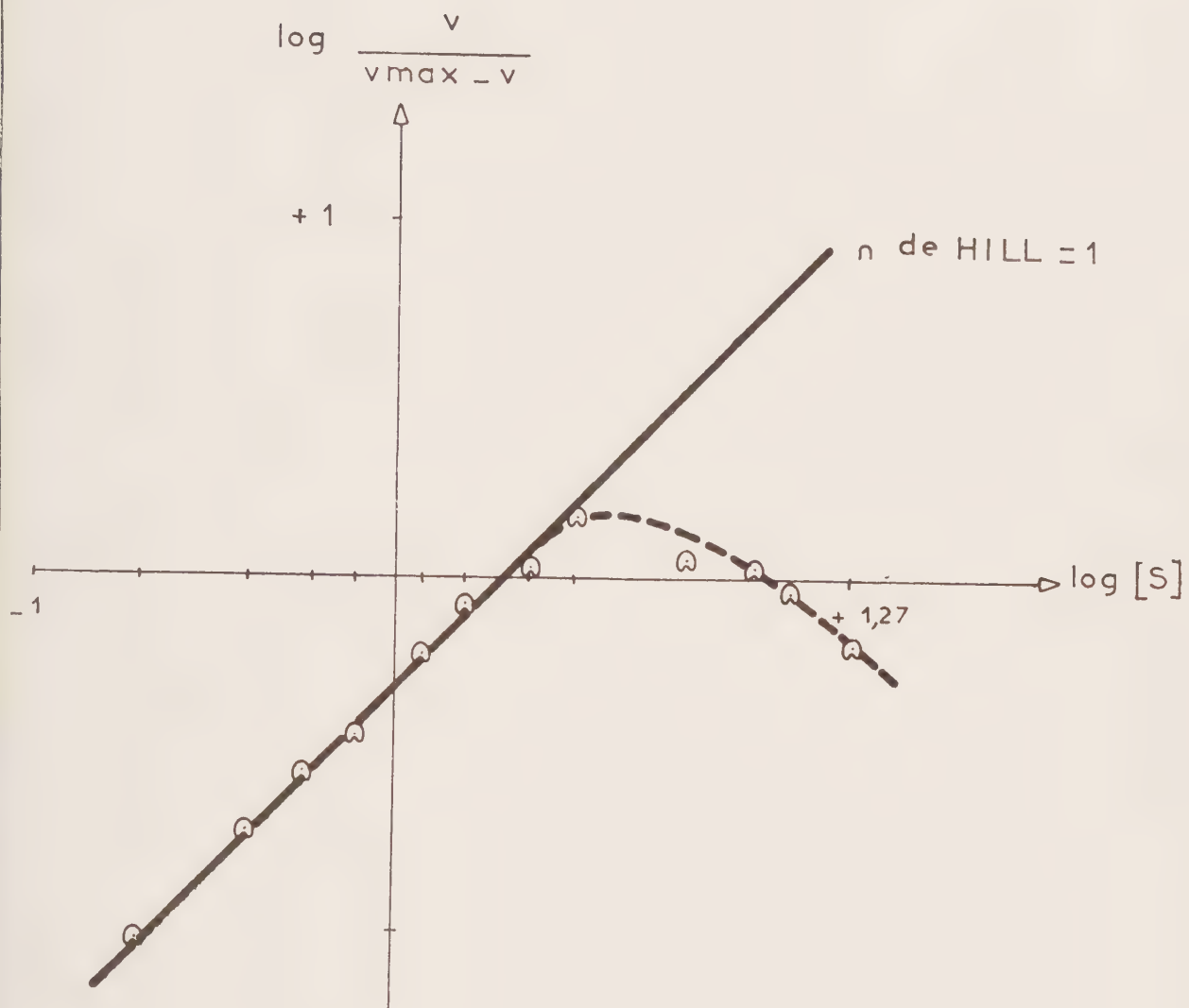
Influence du mannose

Nous avons pu montrer qu'il agit sur l'homogénat, la fraction A et la fraction B purifiées comme un inhibiteur compétitif, c'est à dire qu'il va augmenter la K_m sans altérer la vitesse maximale.

La figure 27 montre la représentation de Lineweaver et Burk pour la fraction A purifiée, en présence de concentration en mannose égale à 0, 100 et 200 mM. (les résultats obtenus avec l'homogénat et la fraction B purifiée étant strictement superposables).

La figure 28 montre la détermination expérimentale de la constante d'inhibition K_i du mannose : elle a été trouvée entre 22 et 25 mM dans 2 essais différents sur la fraction A, sur la fraction B et sur l'homogénat.

FIGURE 26

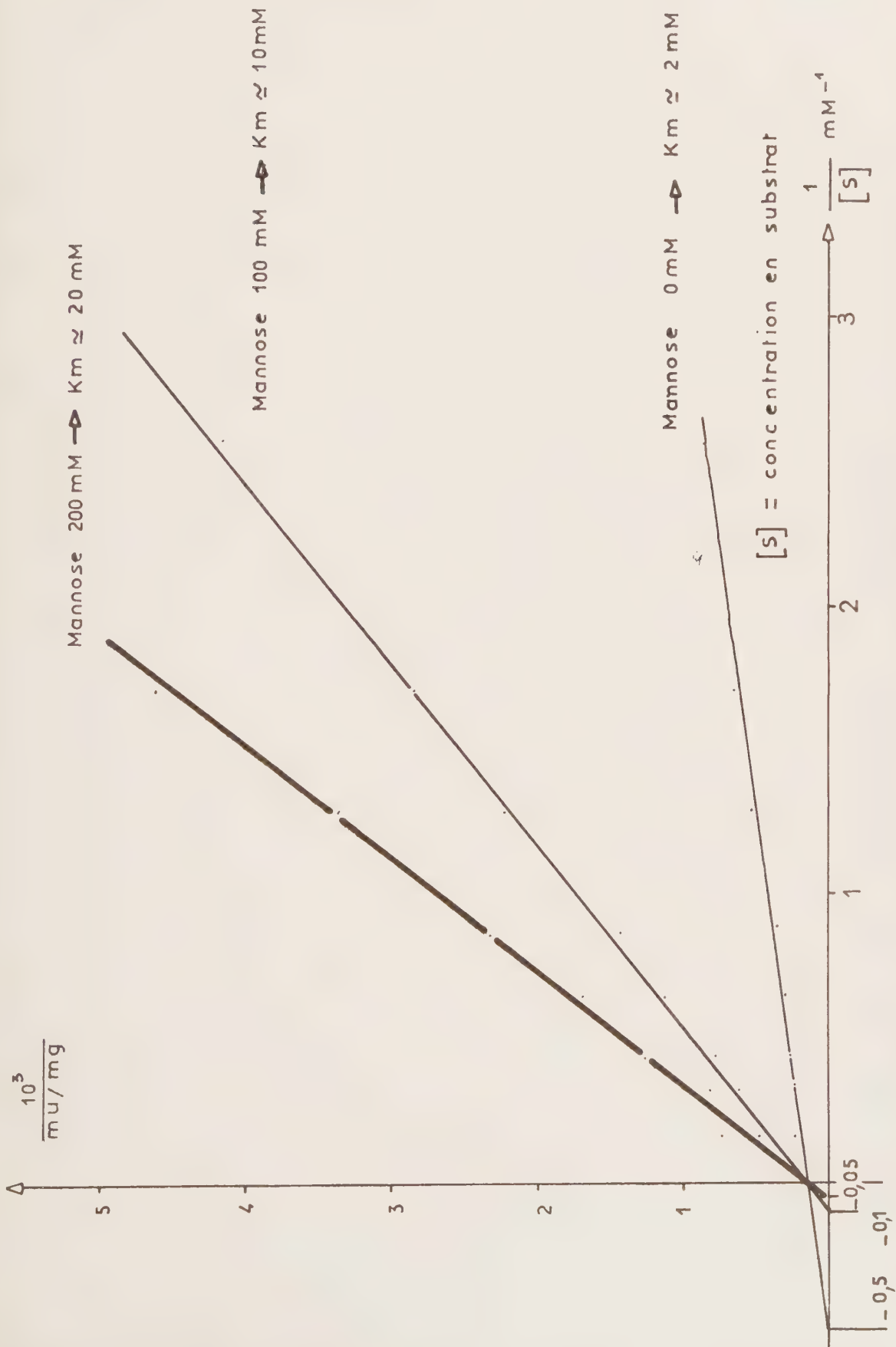


INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT [S]

SUR L'α D MANNOSIDASE ACIDE PLACENTAIRE Fraction A

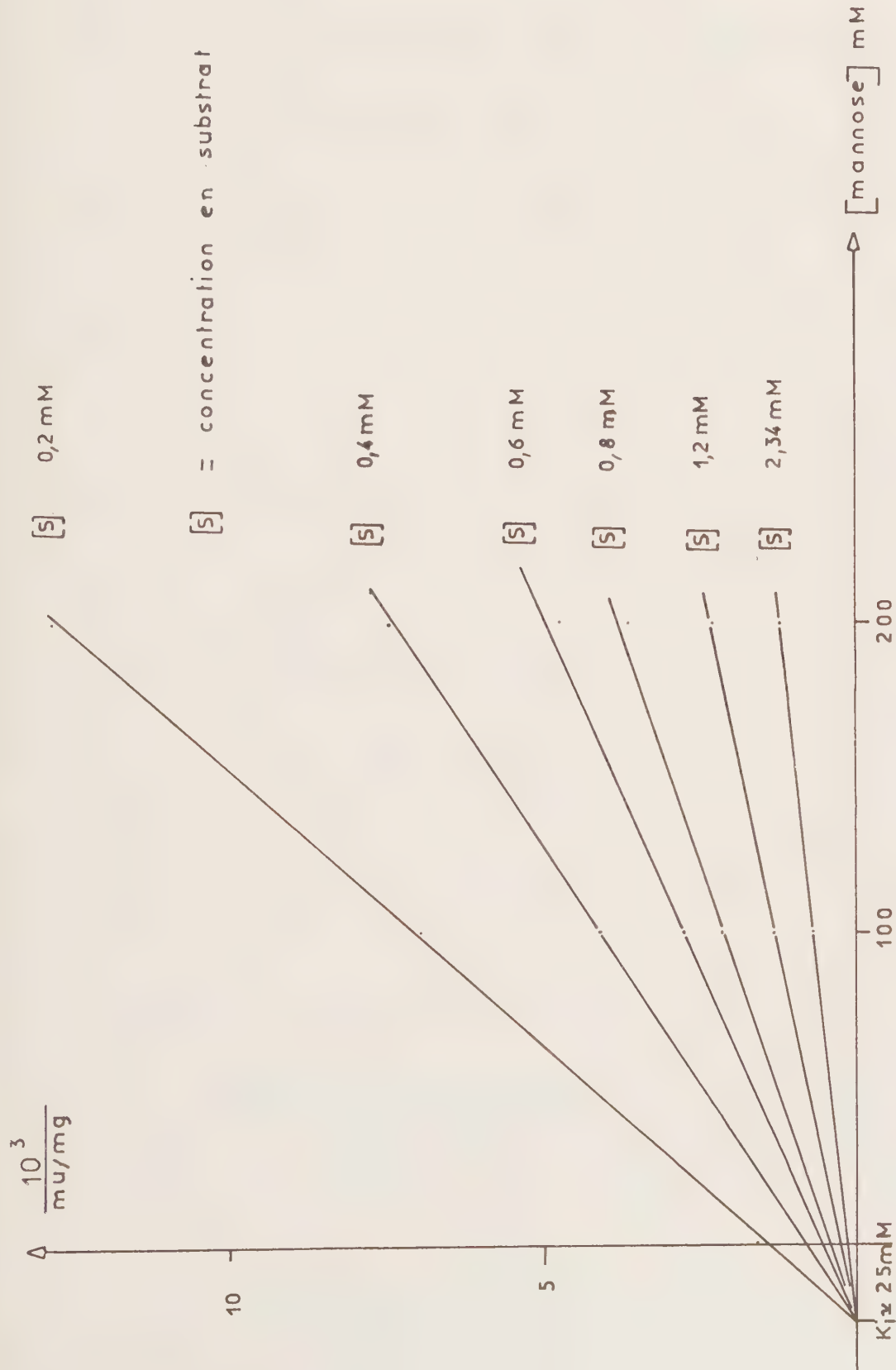
Representation de HILL

FIGURE 27



INFLUENCE DU MANNOSE SUR LA K_m DE L'α-D-MANNOSEDASE ACIDE PLACENTAIRE (pH 4,0)
REPRESENTATION DE LINEWEAVER ET BURK . FRACTION A PURIFIEE .

FIGURE 28



DETERMINATION DE LA CONSTANCE D'INHIBITION DU MANNOSE

FRACTION A DE L' α D MANNOSIDASE ACIDE PLACENTAIRE

On retrouve bien expérimentalement les résultats théoriques permettant le calcul de la K_m apparente K'_m en présence d'un inhibiteur compétitif.

$$K'_m \text{ apparente} = K_m (\text{en l'absence d'inhibiteur}) \left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right)$$

(I) = concentration de l'inhibiteur

K_i = constante d'inhibition

soit pour le mannose 100 mM et la fraction A

$$K'_m = 2 \left(1 + \frac{100}{25}\right) = 10 \text{ mM}$$

et pour le mannose 200 mM et la fraction A

$$K'_m = 2 \left(1 + \frac{200}{25}\right) = 18 \text{ mM}$$

Hypothèse de mécanisme réactionnel d'hydrolyse du substrat 4 MU par la mannosidase : A ce stade nous proposons la séquence réactionnelle suivante :

- 1 - formation d'un complexe enzyme - substrat
- 2 - Libération du premier produit la 4 methylumbelliférone
- 3 - libération du 2eme produit : le mannose.

Il reste à démontrer que la 4 methylumbelliférone n'inhibe pas la réaction. Nous n'avons pas pu pratiquer cet essai : en effet, la methylumbelliférone apportée est trop fluorescente et ôte toute sensibilité au suivi de la réaction ; d'autre part nous n'avons pas pu trouver d'analogues structuraux non fluorescents.

Influence des ions Zn^{++} et Co^{++}

En fonction de leur concentration la figure 29 montre que la fraction B semble plus activée que la A par les ions Zn^{++} (0,5 à 1 mM) ; par contre, cette fraction B semble un peu moins sensible à l'inhibition par le cobalt.

En fonction du pH (figure 30)

. les ions cobalt (5mM) déplacent le pH optimal de la fraction A et de la fraction B de 0,5-0,6 unité pH vers les zones moins acides, L'action est faible si on compare les pH optima.

sur la fraction A 6 % d'inhibition

FIGURE 29

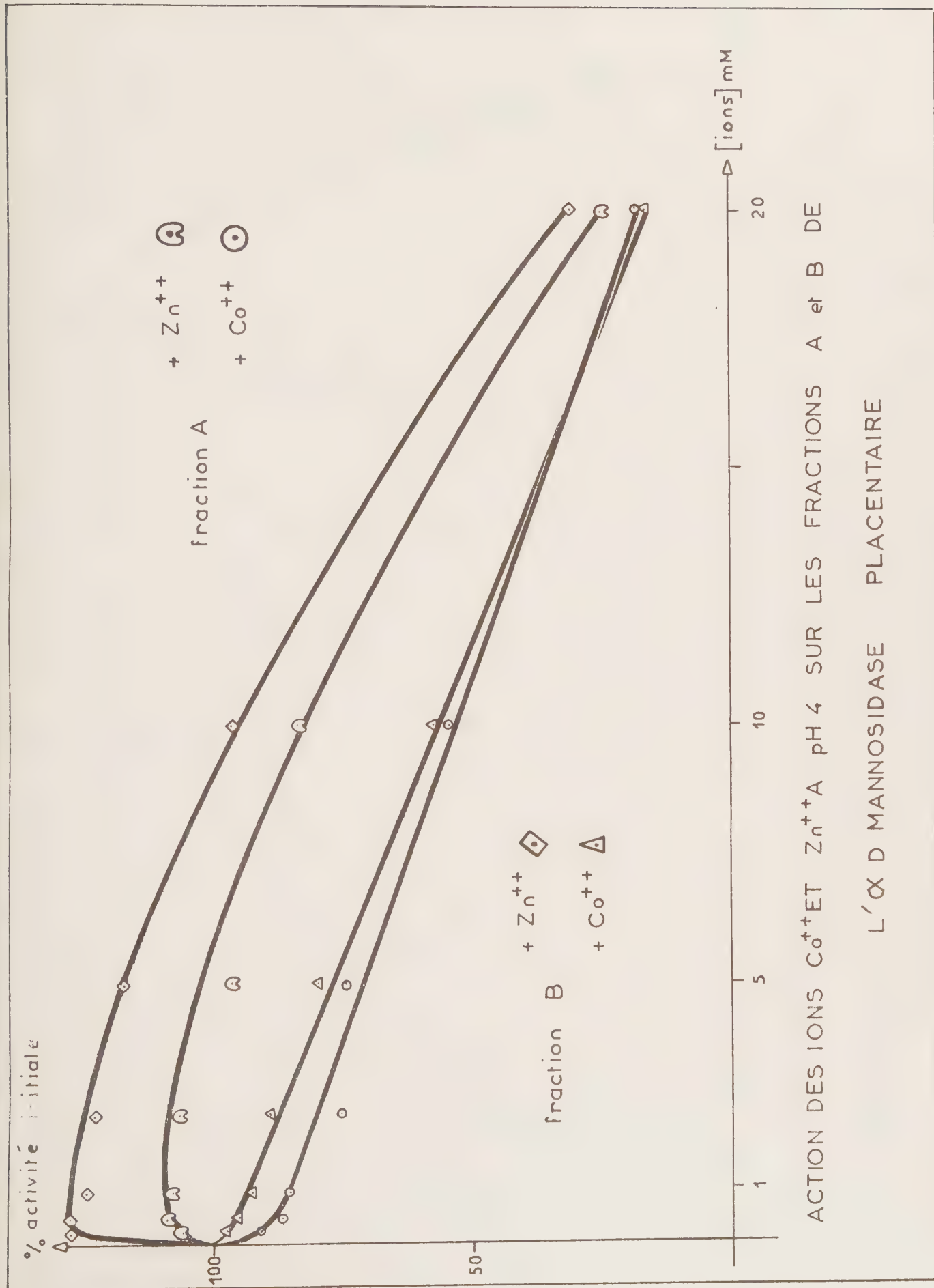
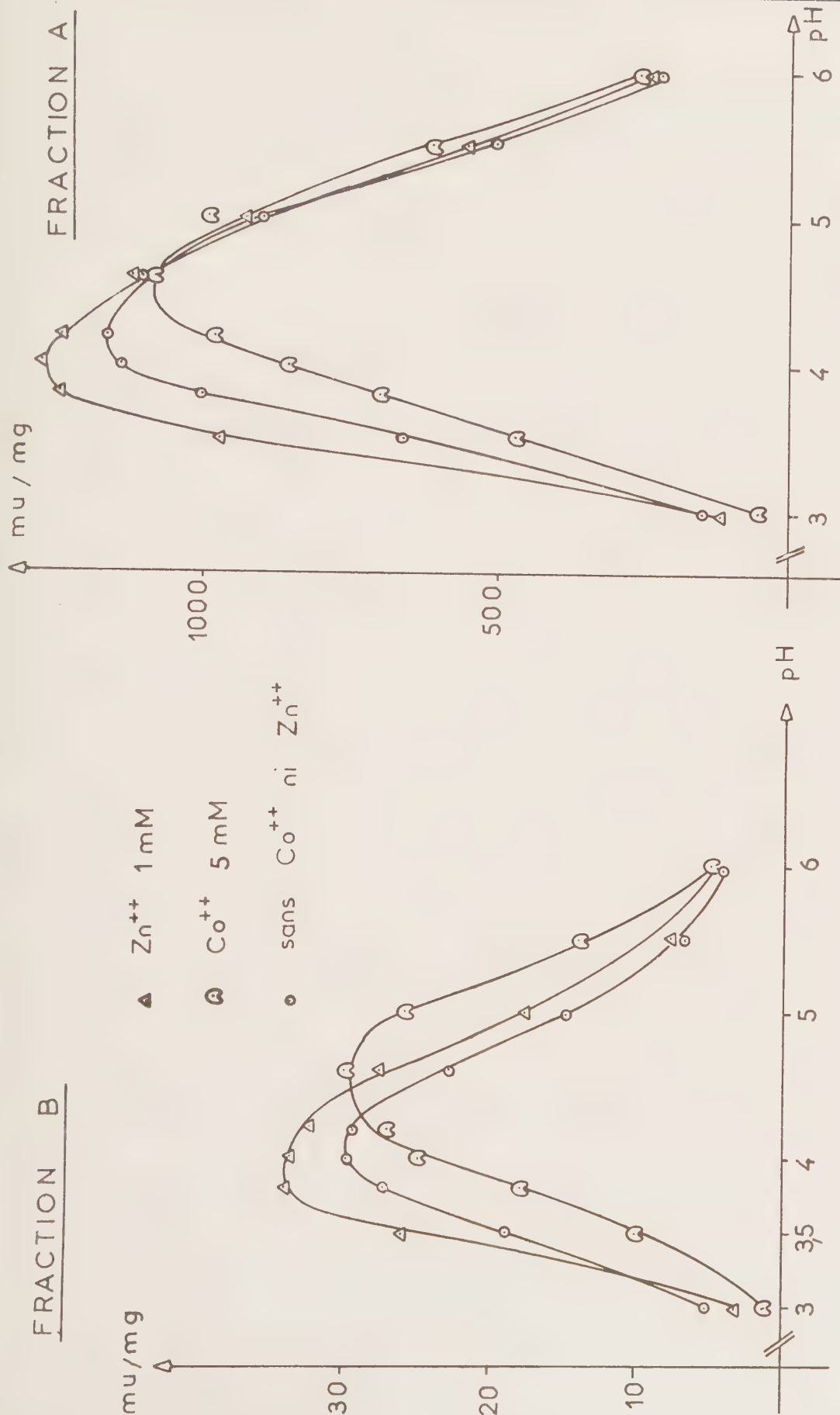


FIGURE 30



INFLUENCE DES IONS Co^{++} (5mM) ET Zn^{++} (1mM) SUR LA COURBE DE pH

DES FRACTIONS A et B DE L' α D MANNOSIDASE ACIDE PLACENTAIRE

sur la fraction B 0 % d'inhibition

. les ions Zn^{++} (1 mM) déplacent le pH optimal des 2 fractions de 0,2 unité pH environ vers les zones plus acides. L'action activatrice est telle qu'aux pH optima :

la fraction B présente 113 % de l'activité qu'elle possède en l'absence de zinc

la fraction A 109 % de l'activité qu'elle possède en l'absence d'ions Zn^{++}

En fonction de la concentration en substrat à pH 4

. K_m :

Les ions Zn^{++} 1mM diminuent la K_m

de 1,5 - 1,6 mM à 1 - 1,10 mM pour l'homogénat

de 1,8 - 2,0 mM à 1,2-1,4-1,2-1,5 mM pour la fraction A

de 1,7 - 2,0 mM à 1,3-1,3-1,1-1,4 mM pour la fraction B

Les ions Co^{++} 5mM augmentent la K_m

de 1,5 - 1,6 mM à 1,8-1,9 mM pour l'homogénat

de 1,8 - 2,0 mM à 2,0-2,4-2,6-2,5 mM pour la fraction A

de 1,7 - 2,0 mM à 2,0-2,2-2,2-2,5 mM pour la fraction B

. V_m

L'action de ces effecteurs sur la vitesse maximale déterminée par la représentation de Lineweaver et Burk est très faible ou nulle.

Action des autres effecteurs sur les fractions A et B

L'EDTA disodique 5 et 10 mM est pratiquement sans action sur les fraction A et B.

Action des ions métalliques (sauf Co^{++} et Zn^{++})

TABLEAU 17

Action des effecteurs métalliques (sauf Co^{++} et Zn^{++})
sur les fraction A et B purifiées

:	:	:	:
:	:	% activité résiduelle	:
:	:	:	:
:	:	Fraction A	Fraction B
:	:	:	:
:	:	:	:
:	Fe^{+++} 1 mM	67 %	76 %
:	$\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3$	:	:
:	:	:	:
:	:	:	:
:	Fe^{++} 2 mM	72 %	73 %
:	FeSO_4	:	:
:	:	:	:
:	:	:	:
:	Mn^{++} 10 mM	87 %	83 %
:	MnCl_2	:	:
:	:	:	:
:	:	:	:
:	Mg^{++} 10 mM	92 %	90 %
:	MgCl_2	:	:
:	:	:	:
:	:	:	:
:	Hg^{++} 5 mM	76 %	85 %
:	HgCl_2	:	:
:	:	:	:
:	:	:	:
:	Ag^+ 0,5 mM	75 %	63,5 %
:	(AgNO_3) 5 mM	11 %	6 %
:	:	:	:

L'Albumine humaine à 0,025 % active légèrement les fractions A : 115 % de l'activité initiale, et B : 118 % de l'activité initiale.

Le mercaptoéthanol et le dithiotreitol 10 mM activent légèrement les fractions A et B (105 - 110 % de l'activité initiale).

L'iodoacétate 1 à 10 mM est pratiquement sans action.

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) même 0,1 mM inhibe presque totalement les fractions A et B.

L'urée est également inhibitrice.

		Activité résiduelle	
		Fraction A	Fraction B
Urée	2 M	33 %	30 %
	8 M	9 %	8 %

Le chlorure de sodium est inhibiteur à forte concentration.

		% activité résiduelle	
		Fraction A	Fraction B
NaCl	50 mM	91 %	90 %
	500 mM	23 %	18 %

Electrophorèse sur acétate de cellulose

La révélation a été faite à pH 3,5. La migration de la fraction B est plus anodique dans les conditions expérimentales que celle de la fraction A (photo 4).

Détermination du point isoélectrique

§ Méthode

Nous avons pratiqué cette analyse dans le service de biochimie du Professeur LOUISOT (UER Sud Ouest de Lyon) sur un appareil LKB.

La solution anodique acide est une solution d'acide sulfurique (0,8 ml) dans une solution aqueuse de saccharose (48 g pour 56 ml d'eau distillée).

La solution basique cathodique est une solution de soude (0,4 g dans 40 ml d'eau distillée).

Un gradient de saccharose est instauré dans la colonne à l'aide d'une solution A (contenant 100 g de saccharose dans 150 ml d'eau distillée et 7,5 ml d'ampholines: 3,75 ml d'ampholines de pH 4-6 et 3,75 ml d'ampholines de pH 5-7) et d'une solution B constituée par 200 ml d'eau distillée (ce volume étant éventuellement un peu réduit si le volume de l'échantillon est important) renfermant 2,5 ml d'ampholines (1,25 ml d'ampholines de pH 4 - 6 et 1,25 ml d'ampholines de pH 5 - 7).

On ajoute à l'échantillon à étudier du saccharose de façon à obtenir une solution à 20 % (poids pour volume) ; du fait de sa concentration saline importante, la fraction B (contaminée largement en hexosaminidase et fucosidase) obtenue par élution d'une colonne de DE 52 a été déssalée par passage sur une petite colonne de Sephadex G 25 avant de la concentrer et d'y dissoudre le saccharose.

La migration a duré 40 Heures ; sur les fractions éluées (5 ml), nous avons mesuré le pH et les activités alpha D mannosidase, alpha L fucosidase et hexosaminidase.

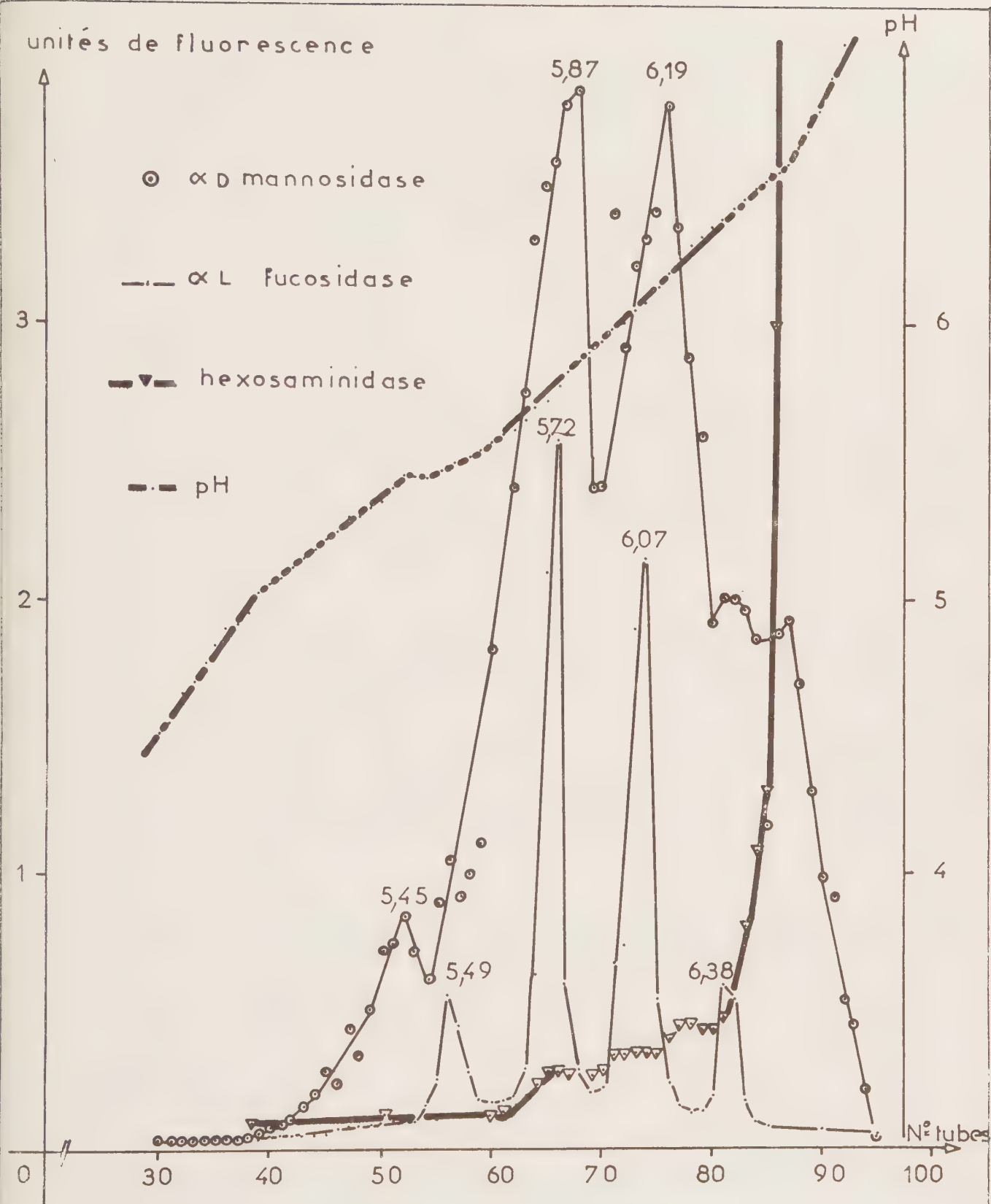
§ Résultats (figure 31)

Les points isoélectriques ont été étudiés uniquement sur la fraction B, la fraction A ayant été détruite au cours de la focalisation par suite d'une panne du cryostat qui réfrigérait la colonne.

Pour l'alpha L fucosidase nous avons trouvé comme point isoélectrique (à la température de la glace fondante) 5,49 - 5,72 - 6,07 et 6,38, ce qui est en assez bon accord avec les résultats de DI MATTEO (77) qui trouve pour l'alpha L fucosidase placentaire 5,19 (6,5 %)- 5,39 (16,2 %)- 5,63 (32 %)- 5,94 (33,5 %) - 6,24 (8,7 %).

L'hexosaminidase de la fraction B s'élue à un pH supérieur à 7, ce qui est tout à fait compatible avec les résultats de SRIVASTAVA (286) sur l'hexosaminidase placentaire B (il trouve un pI de 7,9 contre 5,4 pour l'hexosaminidase A).

FIGURE 31



DETERMINATION DES POINTS ISOELECTRIQUES DE LA
FRACTION B - Focalisation électrique -

Par contre nous ne trouvons qu'une très faible fraction d'alpha D mannosidase B de pI 5,45 (qui pourrait correspondre à une faible contamination de fraction A ou à un pic mineur) et 2 fractions importantes de pI 5,87 et 6,19 (à la température de la glace fondante). Ce fait est surprenant car PHILIPPS (246) trouve dans le foie (milieu toutefois différent), des pI de 5,9 et 6,1 pour la fraction A et 5,45 pour la fraction B.

Conservation de l'enzyme

L'enzyme impure se conserve assez bien sous forme d'homogénat (fraction I et II) ou de précipités dans le sulfate d'ammonium (fractions III et V) surtout à pH 6 ou 7 (où il n'y a aucune perte d'activité en 1 mois à + 4° C) ; par contre cette conservation est beaucoup moins bonne à pH 5 où il y a une perte d'activité de près de 50 % en 15 Jours à + 4° C.

L'enzyme pure, elle, perd très vite son activité.

- . la fraction A la plus purifiée, et la fraction B la moins contaminée perdent 60 à 80 % de leur activité en 10 jours à + 4° C,
- . par contre, si la fraction B est un peu plus contaminée en hexosaminidase et surtout en fucosidase, la perte n'est plus que de 35 - 45 % dans les mêmes conditions.

b) l'enzyme placentaire du fœtus atteint de mannosidose

- essai de purification

Méthode :

Nous disposions au départ de 260 g. de placenta congelé qui ont fourni une fois nettoyés 130 g. de matériel homogénéisé dans 700 ml d'eau bidistillée. Les opérations ont été conduites comme précédemment jusqu'à la sortie de la colonne de Sephadex G 150.

Pour le passage sur DE 52, nous avons employé une colonne plus petite (15 cm x 0,9 cm), un débit plus faible (4 ml par heure) et nous avons recueilli des fractions de 400 microlitres. L'élution a été faite sur 5 heures

- . une heure avec le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6
- . Quatre heures avec le gradient de chlorure de sodium 0 à 0,3 M dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6.

Pour le passage sur Sephadex G 200, nous avons également choisi des colonnes plus petites (30 cm x 0,9 cm), un débit plus faible (2 ml par heure) et recueilli des fractions de 400 microlitres (dépot de 400 microlitres d'échantillon).

Résultats

Ils sont rassemblés dans le tableau 18 :

TABLEAU 18

PURIFICATION DE L'ALPHA D MANNOSIDASE PLACENTAIRE DU FOETUS B

FRACTION N°	II	III	IV	V	VI	A	B
Volume ml	620	200	200	25	0,5	0,3	0,8
Protéines mg/ml	0,15	0,4	0,25	1,35	1,35	0,015	0,45
Alpha mannosidase mU (activité totale) (S) 10 mM	502				18	0,3	16,9
alpha mannosidase mu/mg (activité spécifique)							
(S) 1 mM	0,84	0,53	0,78	1,07			5,5
(S) 10 mM	5,4	1,6	1,78	1,7	26,6	74	47
alpha Man 10 mM	6,4	3,0	2,3	1,6			8,5
alpha Man 1 mM							
alpha L fucosidase mu/mg	252			34			
Hexosaminidase mu/mg	441			30			

Remarques :

Les fractions III et V contiennent un peu de sulfate d'ammonium qui inhibe en partie l'activité

La fraction VI correspond aux tubes 79-90 concentrés en sortie de la colonne de G 150 ; le profil d'élution montre que l'on élué en même temps que l'alpha D mannosidase, la moitié de la fucosidase et une partie de l'hexosaminidase.

L'élution de la colonne de DE 52 permet de séparer une fraction A (tubes 14 à 21) contaminée d'une quantité à peu près équivalente de fucosidase et d'hexosaminidase, une fraction B (tubes 26 à 47) contaminée par la fucosidase et par une partie de l'hexosaminidase restantes.

Cette fraction B est beaucoup plus importante que la fraction A à peine détectable dans ce cas.

Le passage sur colonne de G 200 a entraîné la perte de l'activité déposée.

- propriétés

Nous avons étudié principalement l'homogénat et les fractions III et V du fait de la perte ultérieure de l'activité.

influence du pH :

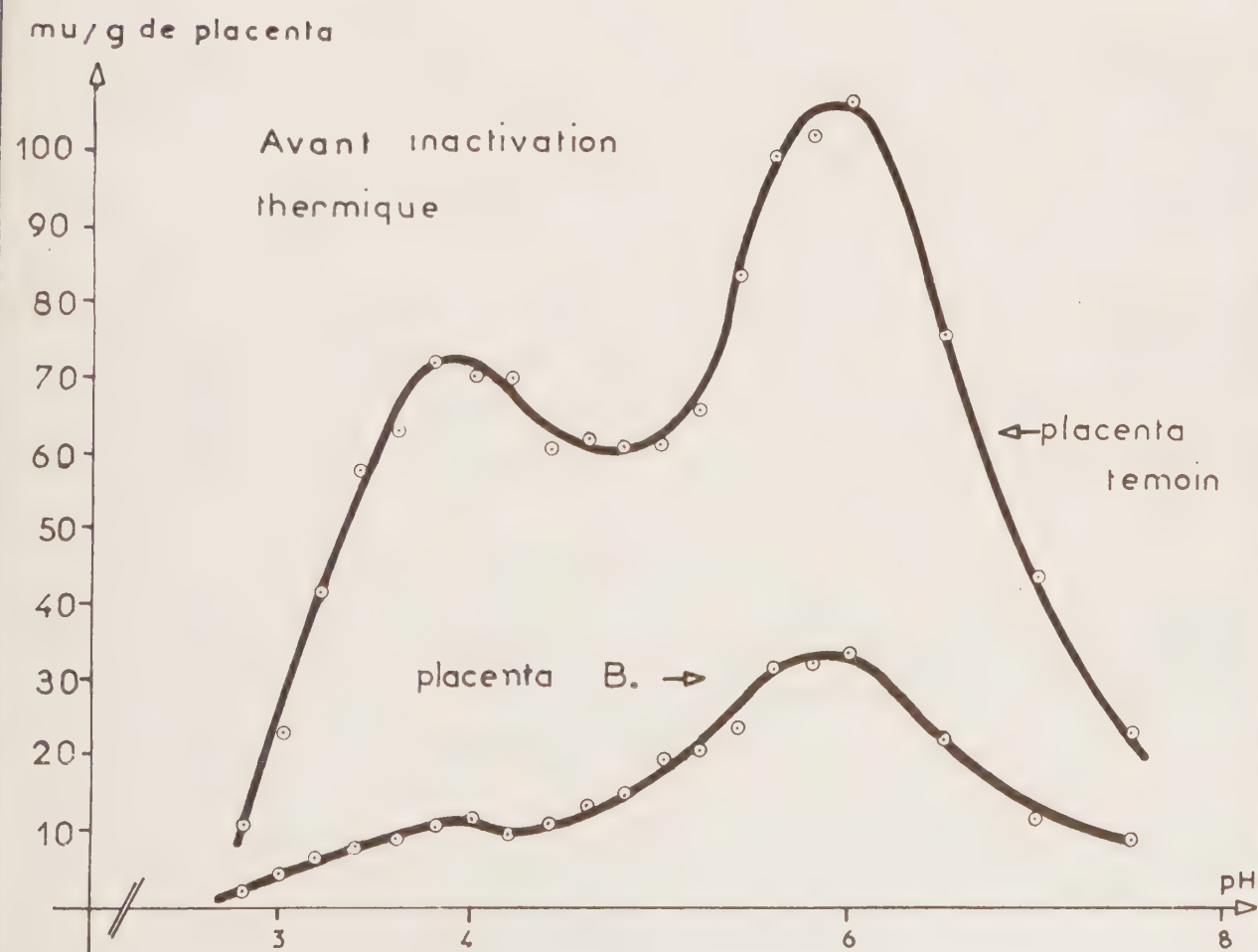
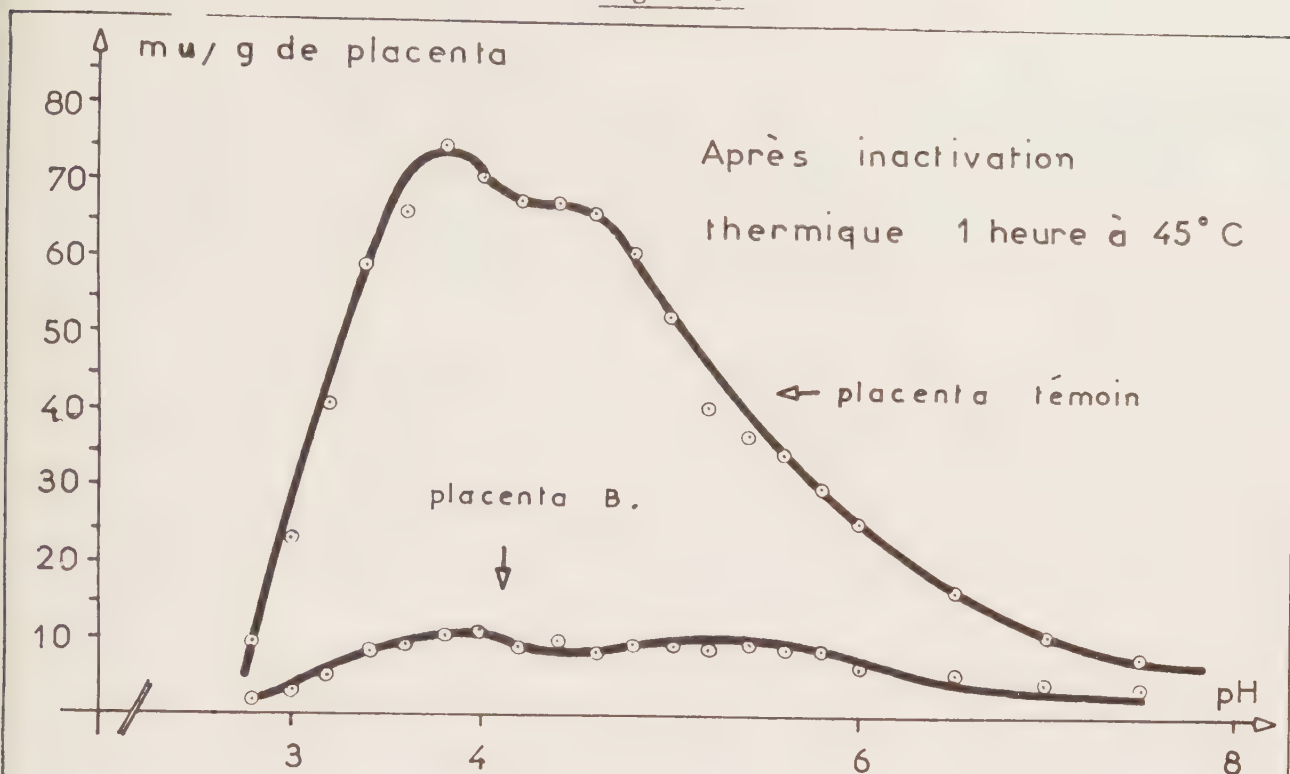
La figure 32 objective la diminution de l'alpha D mannosidase acide placentaire thermostable dans le placenta du foetus atteint. L'activité plus neutre parait aussi diminuée mais les placentas témoins montrent des activités très variables pour cette forme très fragile.

Influence de la concentration en substrat MU : Interférence du cobalt (5 mM), du zinc (1 mM) et du mannose.

ETUDE DE L α D MANNOSIDASE DANS LE PLACENTA

Influence du pH . Concentration en substrat 1mM

Figure 32



§ Sur l'homogénat. Si l'on mesure l'activité de l'alpha D mannosidase dans le placenta B en fonction de la concentration en substrat MU (directement ou après addition d'EDTA 1 mM ou après passage sur Sephadex G 25), la courbe obtenue paraît biphasique (figure 33) et la représentation de Lineweaver et Burk (figure 34) conduit à déterminer 2 droites.

Pour une concentration en substrat inférieure à 1 mM, la K_m apparente obtenue est de l'ordre de 2 mM (vitesse maximale 0,53 μ u/mg).

Pour une concentration en substrat supérieure à 1,1 mM, la K_m apparente est de l'ordre de 30 mM (vitesse maximale 5 μ u/mg).

La représentation de HILL (figure 35) permet de déterminer 2 pentes pour (S) inférieure à 2 mM $n = 0,8$,
pour (S) supérieure à 2 mM $n = 1,1$.

En présence de zinc (Zn^{++} 1 mM), l'activité est stimulée à toute concentration en substrat (figure 33) et la représentation de Lineweaver et Burk (Figure 34) conduit également à déterminer 2 pentes :

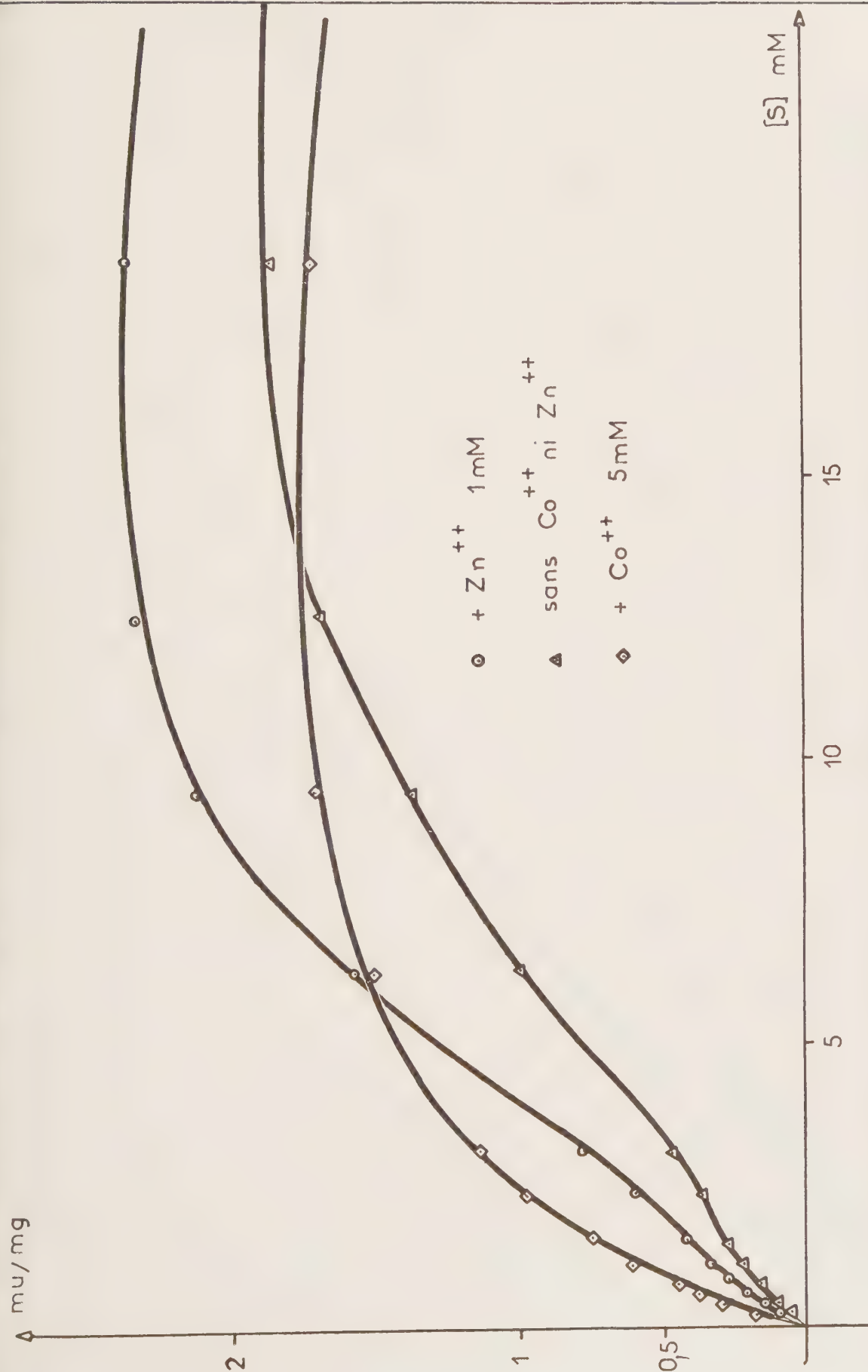
pour (S) inférieure à 1,2 mM $K_m \simeq 1,8$ mM ($V_m = 0,82$ μ u/mg),
pour (S) supérieure à 1,2 mM $K_m \simeq 25$ mM ($V_m = 5,5$ μ u/mg).

En présence de cobalt Co^{++} (5mM) l'activité est stimulée surtout aux faibles concentrations en substrat MU (figure 33) ; la courbe perd son aspect biphasique et la représentation de Lineweaver et Burk permet de calculer une K_m unique égale à 2,9 mM à toute concentration en substrat ($V_m = 2,1$ μ u/mg).

En présence de mannose (figure 36) :

Aux faibles concentrations en substrat, le mannose ne paraît pas se conduire comme un inhibiteur compétitif ou bien sa constante d'inhibition est très élevée et les concentrations choisies pour cette étude 100 et 200 mM ne peuvent mettre ce phénomène en évidence.

Aux fortes concentrations en substrat (supérieures à 2,5 mM), il est difficile d'affirmer formellement que l'on a un inhibiteur compétitif et dans ce cas la K_i se situerait au delà de 250 mM.



α D MANNOSIDASE - HOMOGENAT PLACENTA B. - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION

EN SUBSTRAT A ' pH 4 -



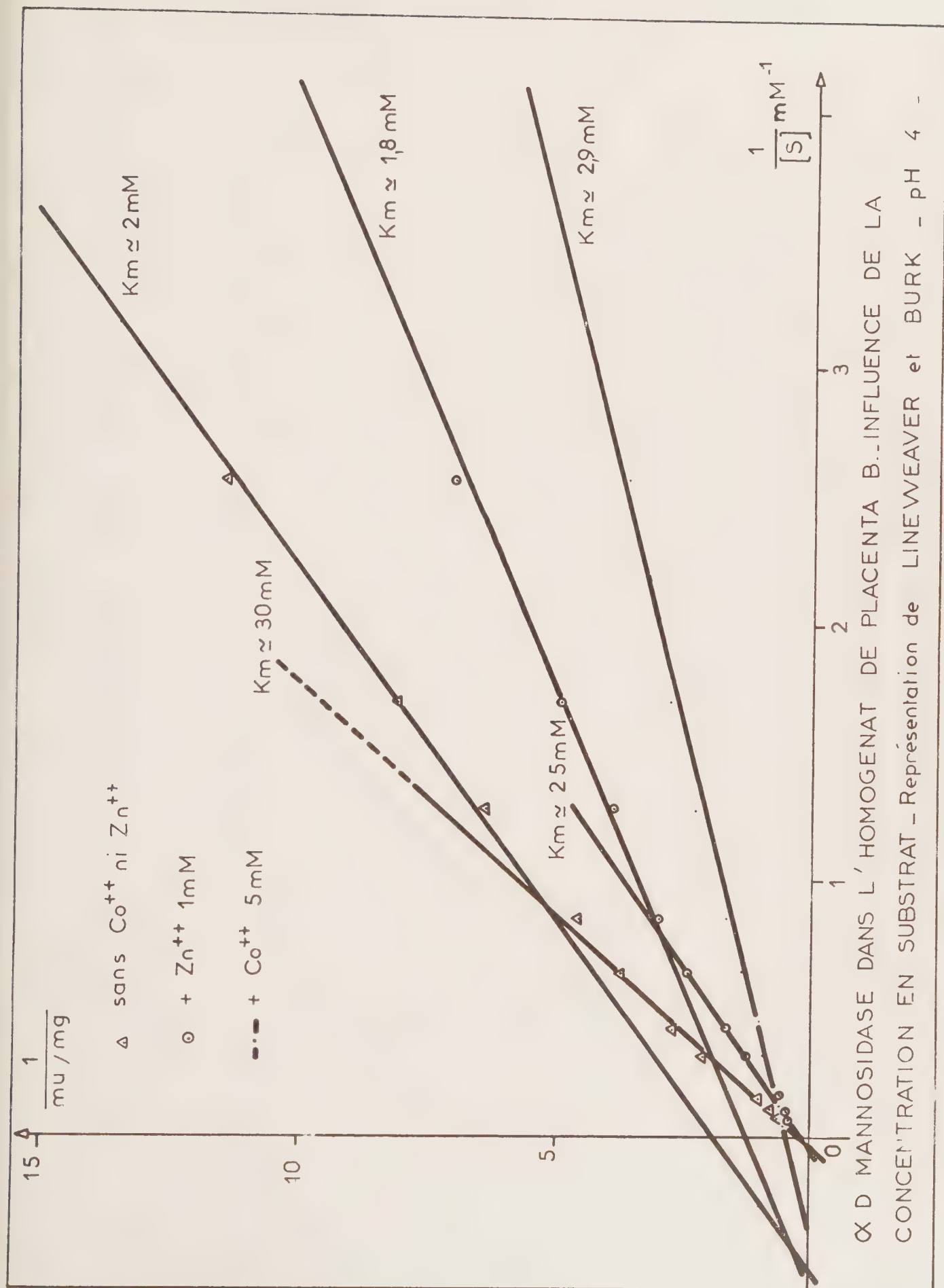
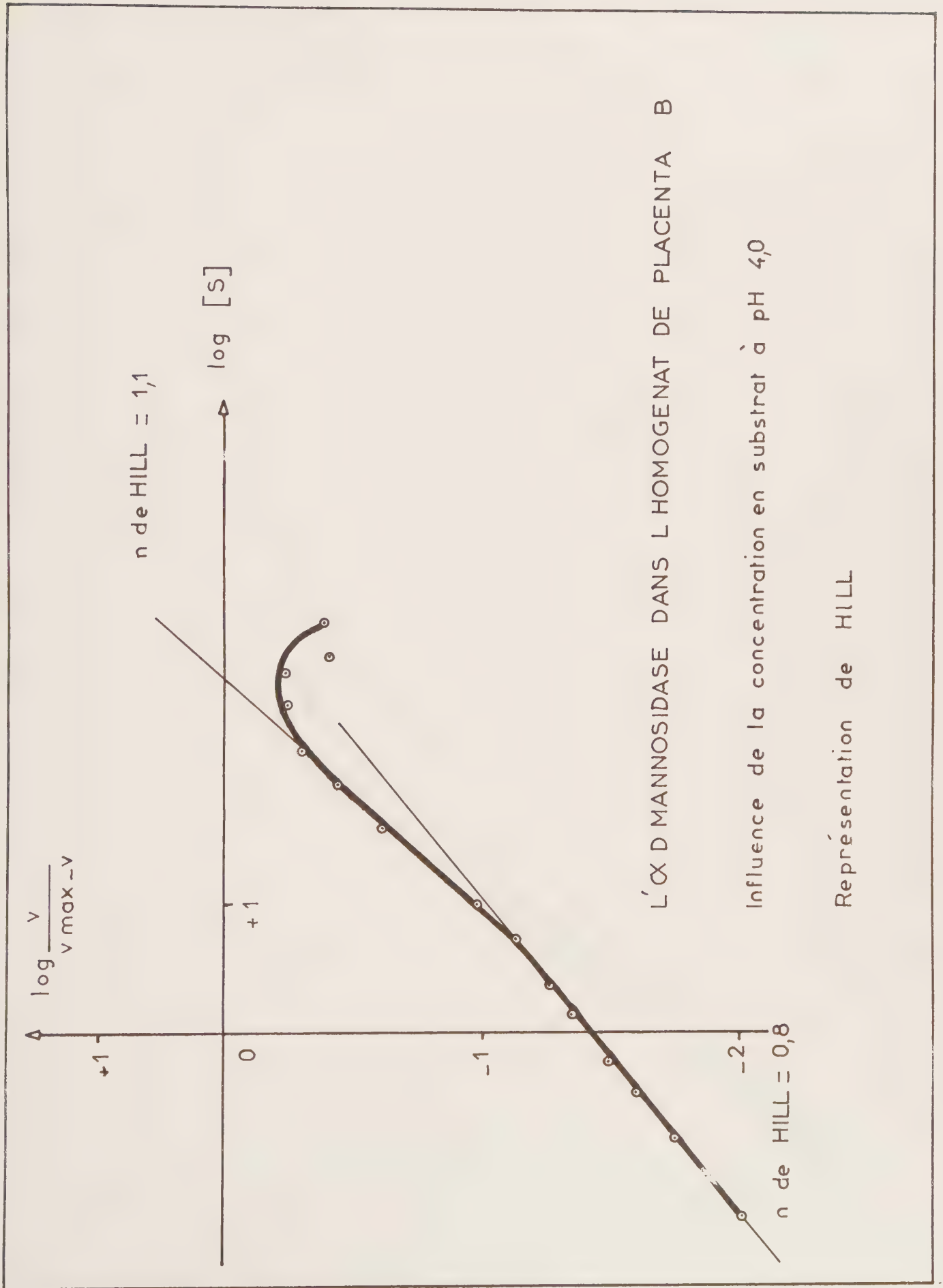
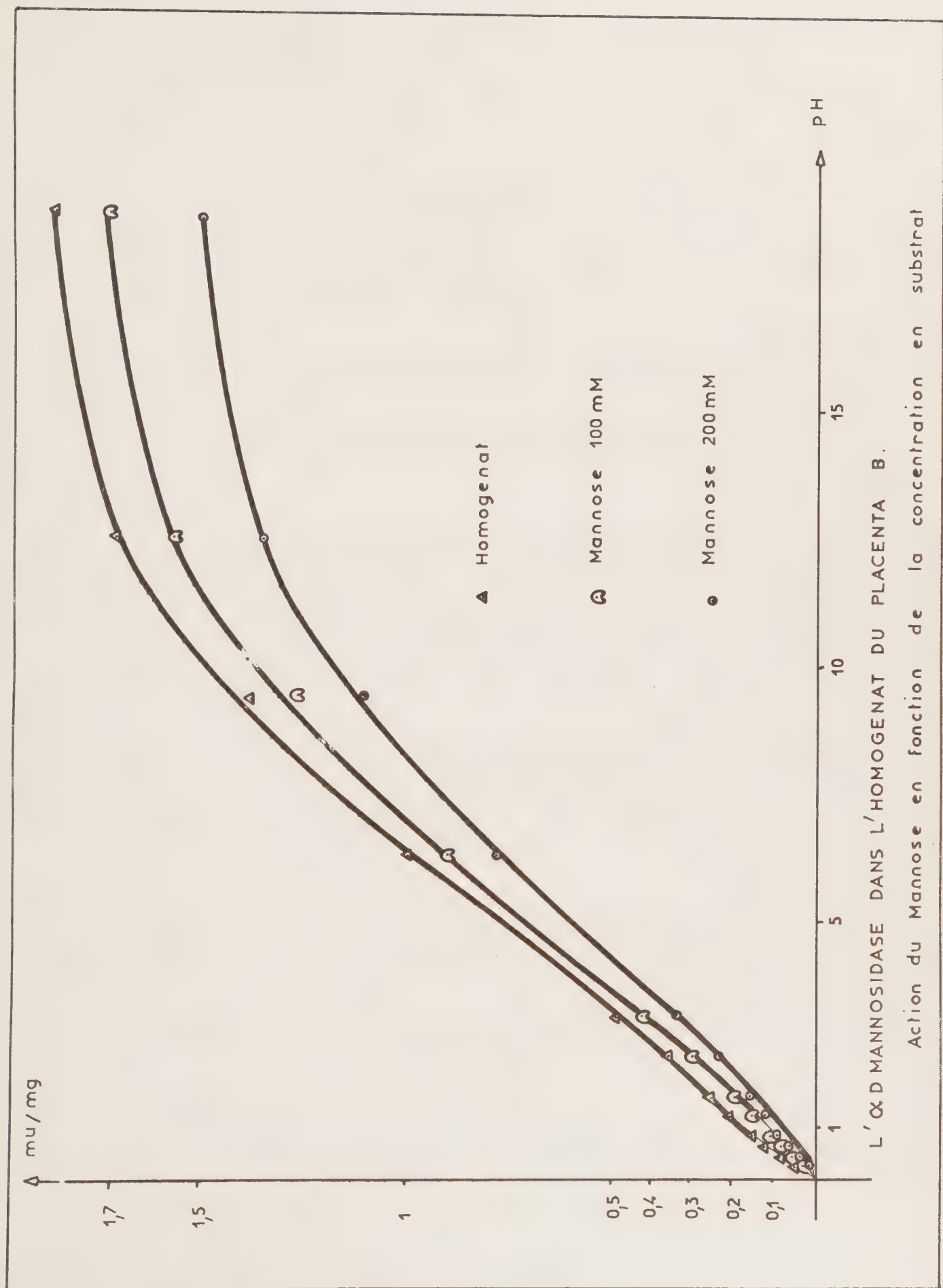




FIGURE 35









§ sur la fraction V c'est à dire après traitement du placenta par la chaleur et le sulfate d'ammonium, l'enzyme semble se trouver sous une seule conformation de K_m 2 mM (figure 37) ($V_m = 2$ mu/mg)

Les ions cobalt Co^{++} (5mM) stimulent beaucoup l'activité et pour toute concentration en substrat, la K_m trouvée est du même ordre (2 mM) mais la vitesse maximale est très augmentée : 7,7 mu/mg ; par contre l'enzyme devient plus sensible à l'inhibition par le substrat.

Les ions zinc Zn^{++} (1 mM) rendent une allure biphasique à la courbe :
pour une concentration en substrat inférieure à 1,2 mM $K_m \approx 2$ mM,
 $(V_m = 3,6$ mu/mg)
pour une concentration en substrat supérieure à 1,3 mM $K_m \approx 10$ mM.
 $(V_m = 7,7$ mu/mg)

En présence de mannose 100 et 200 mM, les K_m apparentes calculées par la représentation de Lineweaver et Burk deviennent 2,6 - 2,7 mM et 3 mM et la constante d'inhibition du mannose pour les concentrations en substrat supérieures à 0,6 mM (les concentrations inférieures donnent des chiffres trop imprécis) paraît se situer vers 800 - 1000 mM.

Il semble donc bien que selon les conditions des différentes étapes de la purification, une ou deux conformations soient actives ce qui explique les variations du rapport des activités aux concentrations en substrat 1 et 10 mM dans le tableau de purification.

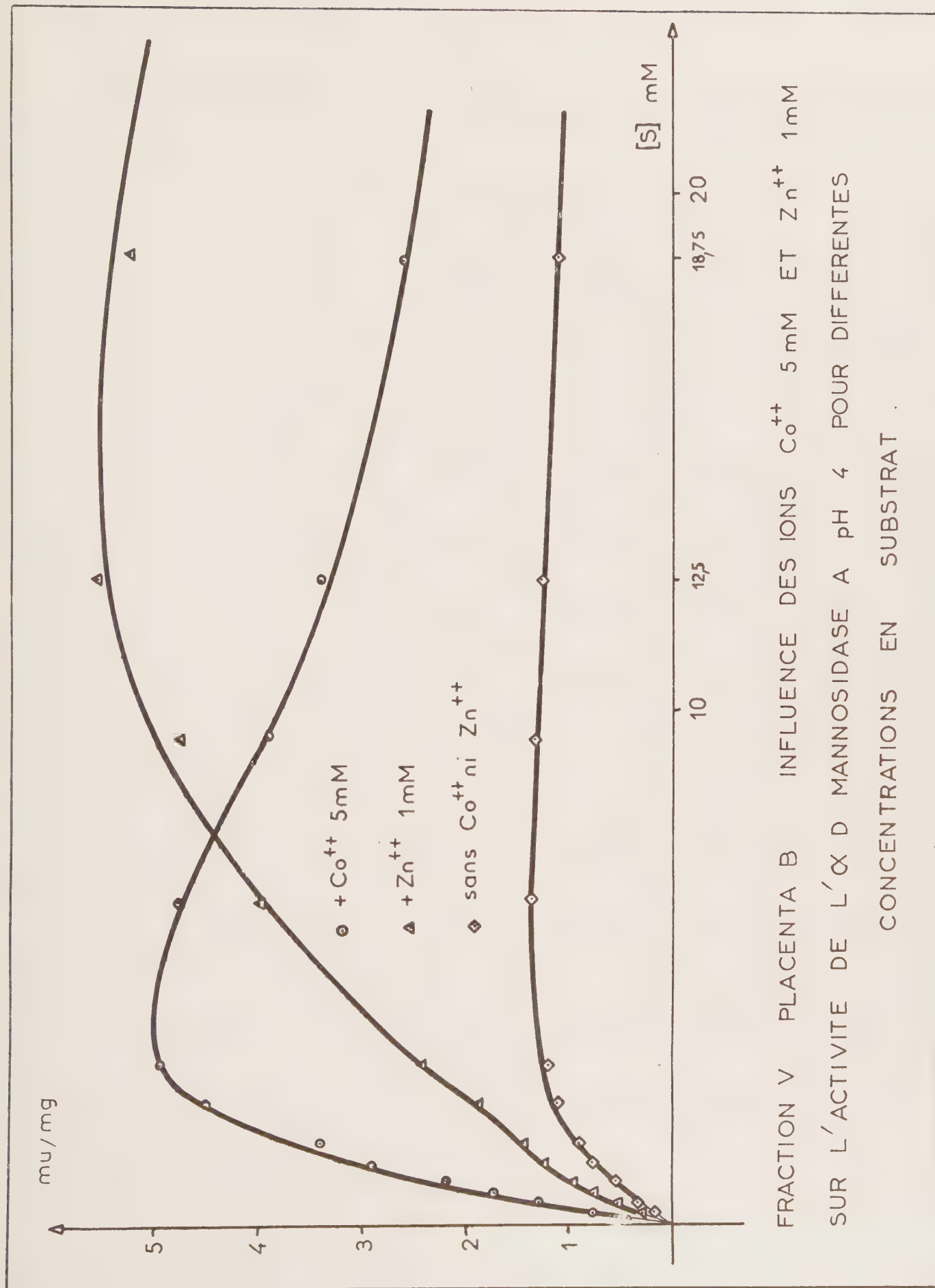
Influence des autres effecteurs sur la fraction III (comparativement à une fraction III témoin).

Cette influence a été étudiée avec une concentration en substrat de 10 mM.

L'EDTA disodique à une action à peu près nulle.

L'action des ions métalliques sauf Co^{++} et Zn^{++} , est résumée dans le tableau 19 :





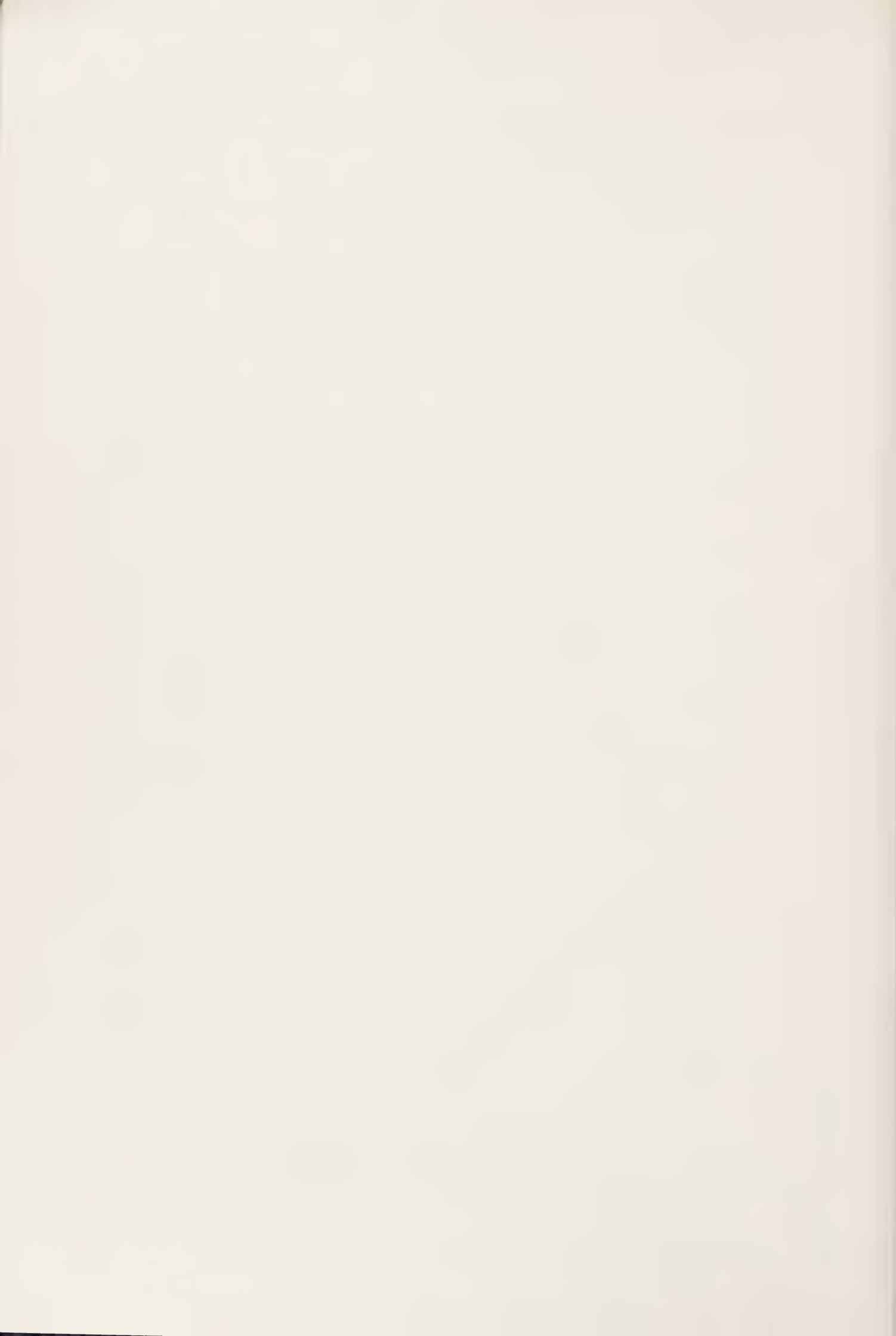


TABLEAU 19

Action des effecteurs métalliques sauf Co^{++} et Zn^{++} sur l' α -D mannosidase placentaire (purification au stade de la fraction III)

		% activité résiduelle	
		Fraction III Témoin	Fraction III du foetus B
Fe^{+++}	1 mM	83 %	229 %
Fe^{++}	2 mM	80 %	40 %
Mn^{++}	10 mM	89 %	310 %
Mg^{++}	10 mM	90 %	280 %
Hg^{++}	5 mM	90 %	65 %
Ag^{+}	0,5 mM	85	75
	5 mM	20	30

L'albumine humaine à 0,025 % a très peu d'action sur la fraction III témoin et active la fraction III du foetus B à 120 %.

Le mercaptoéthanol et le dithiotreitol 10 mM activent légèrement (110 %) les 2 fractions III.

L'iodoacétate 10 mM est pratiquement sans effet dans les 2 cas.

Le dodécylsulfate de sodium est totalement inhibiteur à partir de 0,5 mM dans les deux cas.



La fraction III du malade résiste beaucoup mieux à l'urée 8N que celle du témoin (90 % d'inactivation pour le témoin et 60 % pour le malade).

Le chlorure de sodium inhibe la fraction III témoin et stimule celle du malade.

		% activité résiduelle	
		Fraction III témoin	Fraction III étudiée
NaCl	50 mM	95 %	350 %
	500 mM	76 %	320 %

Le pH (en tampon citrate phosphate). La courbe de pH conduit :

pour le témoin : à un pic pointu de pH optimal 3,8 (chûtant rapidement à partir de 3,5 et 4,6).

pour le malade : à un pic beaucoup plus large entre pH 3,8 et 5.

En résumé, le comportement comparatif de l'enzyme placentaire du foetus atteint et de témoins met en évidence les points suivants :

- influence de la concentration en substrat :

chez le témoin : une cinétique Michaelienne

chez le malade : une cinétique biphasique qui peut reprendre à certaines étapes de la purification une allure michaelienne mais alors avec une vitesse maximale extrêmement faible.

- les ions Zn^{++} activent l'enzyme témoin comme l'enzyme mutante à toute concentration en substrat.

- Le cobalt augmente la K_m de l'enzyme normale pour le substrat MU ;



il active par contre l' α mannosidase mutante, surtout aux faibles concentrations en substrat, et lui redonne une cinétique apparente michaelienne.

- Le mannose inhibiteur compétitif puissant de l'enzyme normale, inhibe peu l'enzyme mutante.



II.8 - ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE ACIDE DU FOIE FOETAL

Les activités des hydrolases acides ont été étudiées dans le foie du foetus par comparaison avec celles d'un foie de prématuré de 6 mois sur des homogénats à 10 %.

TABLEAU 20

ETUDE DES HYDROLASES ACIDES DANS L'HOMOGENAT DE FOIE DU FOETUS B.

: Activité étudiée	: Foie de	: Foie Foetus	: Valeurs habituelles
:	: Prématuré	: B	: des contrôles
:	: mu/g foie	: mu/g foie	: (foies enfants)
:	:	:	:
: Beta galactosidase	: 640	: 880	: 335 à 1.330
:	:	:	:
: Alpha L Fucosidase	: 231	: 438	: 142 à 460
:	:	:	:
: Hexosaminidases	:	:	:
: - totale	: 2621	: 3675	: 169 à 2.845
: - Thermolabile	: 1594	: 2135	: 1151 à 2.010
: - % thermolabile	: 61	: 58	: 60 à 76 %
:	:	:	:
: Beta D glucuronidase	: 1187	: 1276	: 835 à 1328
:	:	:	:
: Arylsulfatase A	: 161,5	: 387	: 120 à 434
:	:	:	:
: Alpha galactosidase	: 110	: 218	: 72 à 150
:	:	:	:
: Alpha Mannosidase pH 4	:	:	:
: - 1 mM	: 38	: 4,3	: -
: - 7,8 mM	: 65	: 90	: 44 à 80
:	:	:	:

Le déficit en alpha D mannosidase acide n'apparaît qu'à faible concentration en substrat (figure 38).

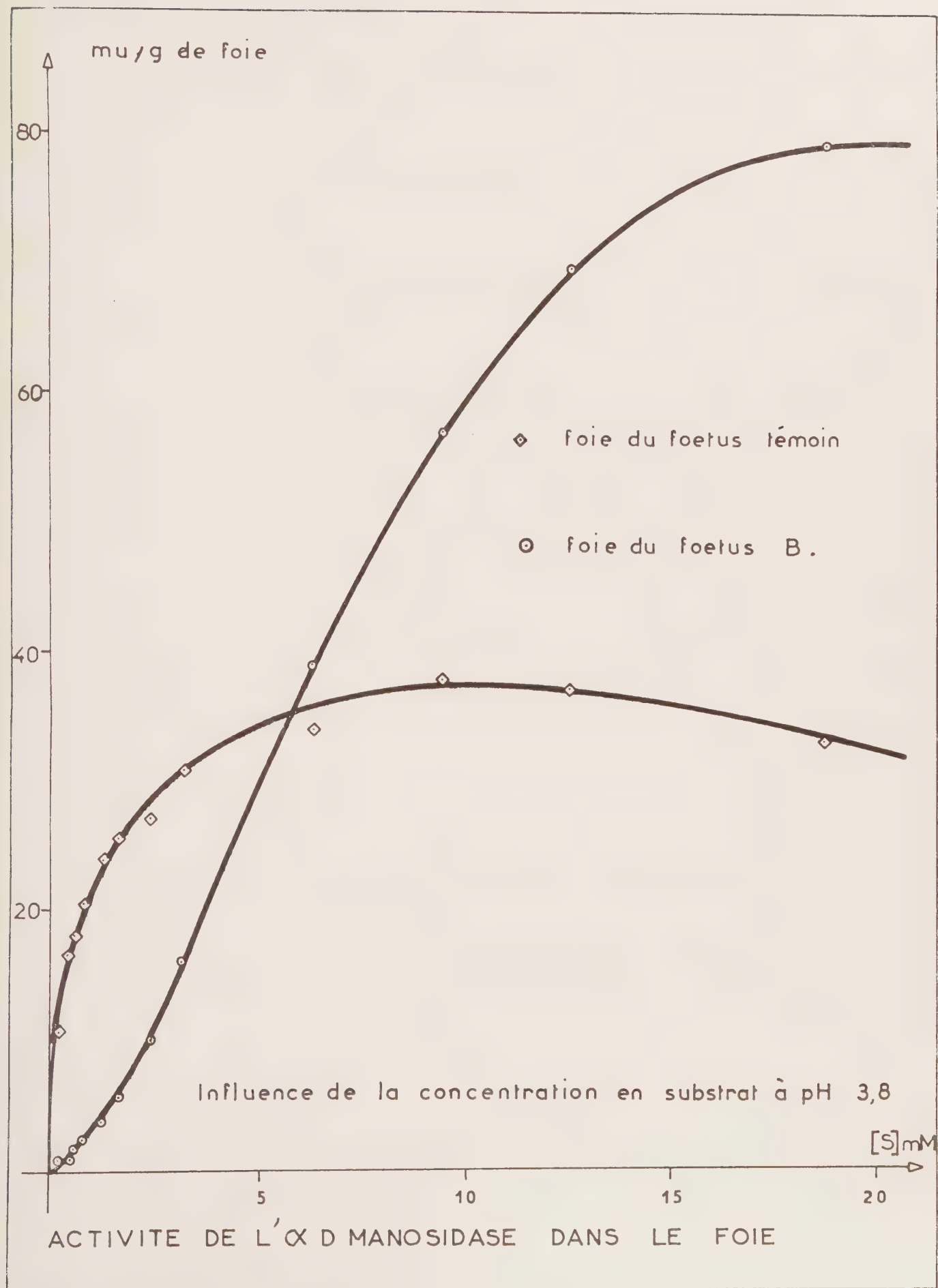
a) semi-purification

Le foie du foetus B a été :

- lavé dans du sérum physiologique
- homogénéisé dans l'eau distillée à l'aide de l'appareil ILA CX
- centrifugé 20 minutes à 20.000 g à + 4° C.



FIGURE 38





Le surnageant a été précipité par du sulfate d'ammonium à 55 % de saturation. Le précipité obtenu a été ensuite redissout dans du tampon sulfate de sodium 10 mM pH 6.

Le mélange a été inactivé 1 heure à 45° C puis centrifugé 20 minutes à + 4° C à 20.000 g.

Le surnageant obtenu a été dessalé par passage sur Sephadex G 25 et concentré sur membrane Diaflo XM 50 : Fraction F

Cette fraction F a été appliquée sur une petite colonne de DE 52 de hauteur 15 cm et de diamètre 0,9 cm. Un débit de 4 ml / heure a été instauré pour l'élution. Des fractions de 400 microlitres par tube ont été recueillies. L'élution a été commencée avec du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6 jusqu'à récupération du pic A (tubes 9 à 21). Puis à partir du tube 32, le tampon d'élution a été remplacé par le même tampon contenant du chlorure de sodium 0,3 M qui a rapidement élué la fraction B (tubes 44 à 50). A la différence de ce qui a été obtenu pour le placenta du foetus B, le foie du foetus B a présenté une activité principale dans la fraction A. (la sortie des pics d'alpha D mannosidase a été suivie en employant une concentration en substrat de 10 mM et à pH 3,8).

b) Propriétés

L'influence du pH sur l'activité de l'alpha D mannosidase montre que le déficit chez le foetus B (figure 39) porte sur la fraction acide thermostable.

Influence de la concentration en substrat : interférence des ions cobalt et zinc

- Homogénat (figure 40-41).

L'homogénat normal suit une cinétique de type Michaelis et la représentation de Lineweaver et Burk permet de déterminer une Km de 0,92 à 1 mM et la représentation de HILL permet de calculer un n de HILL égal à 1.



FIGURE 39

ACTIVITE DE L'α.D.MANNOSEDASE DANS LE FOIE . Influence du pH

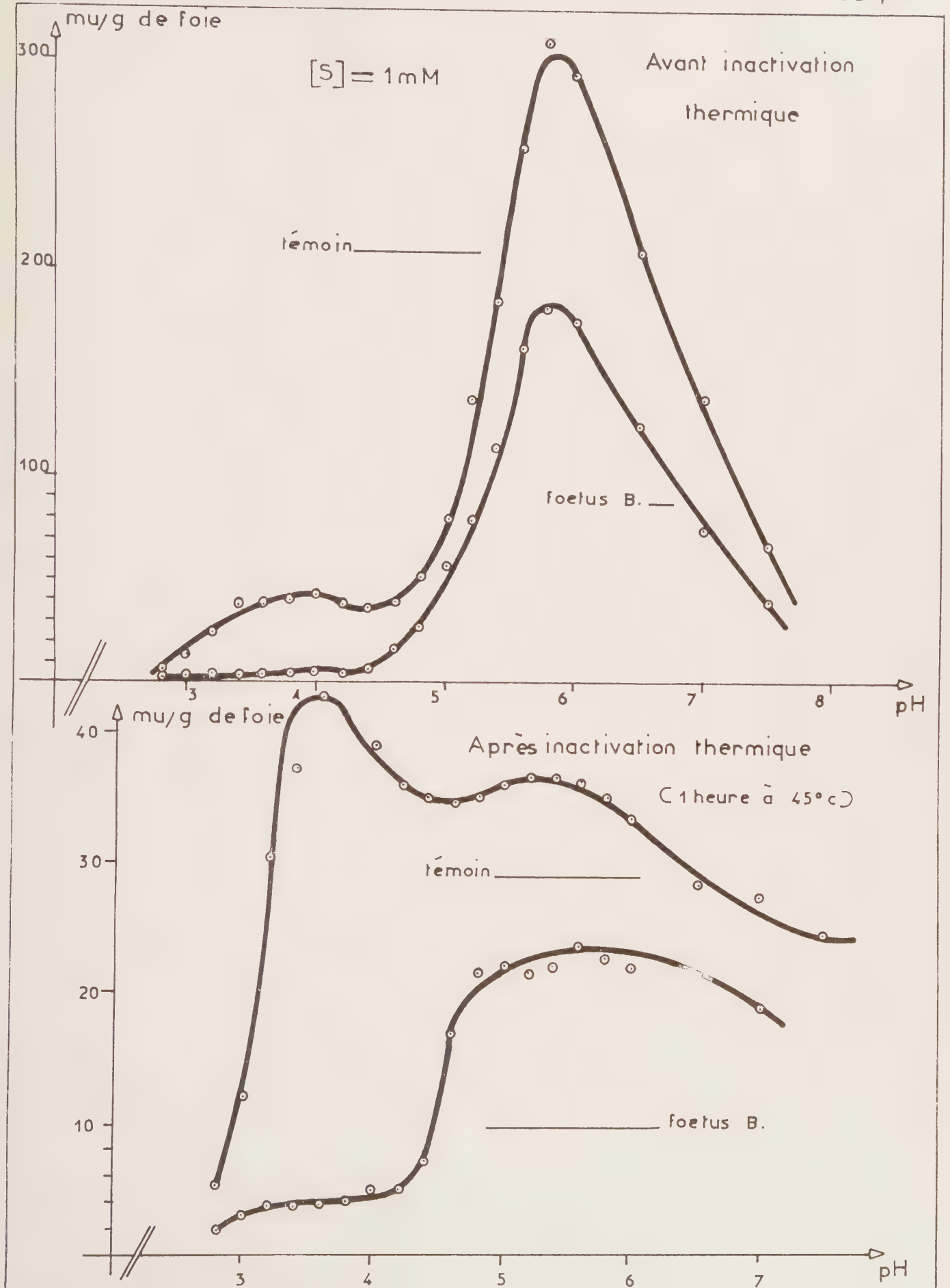


FIGURE 40

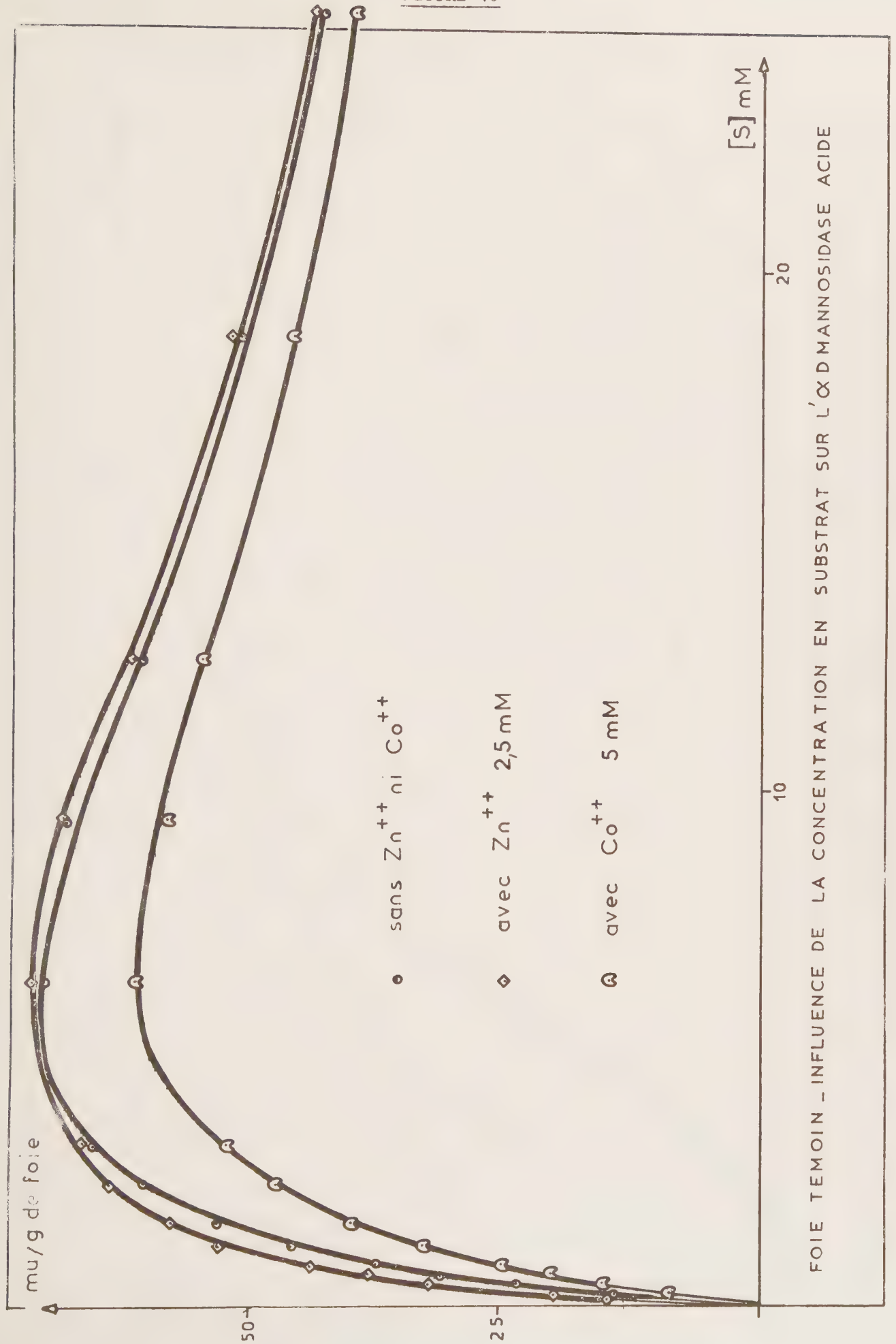
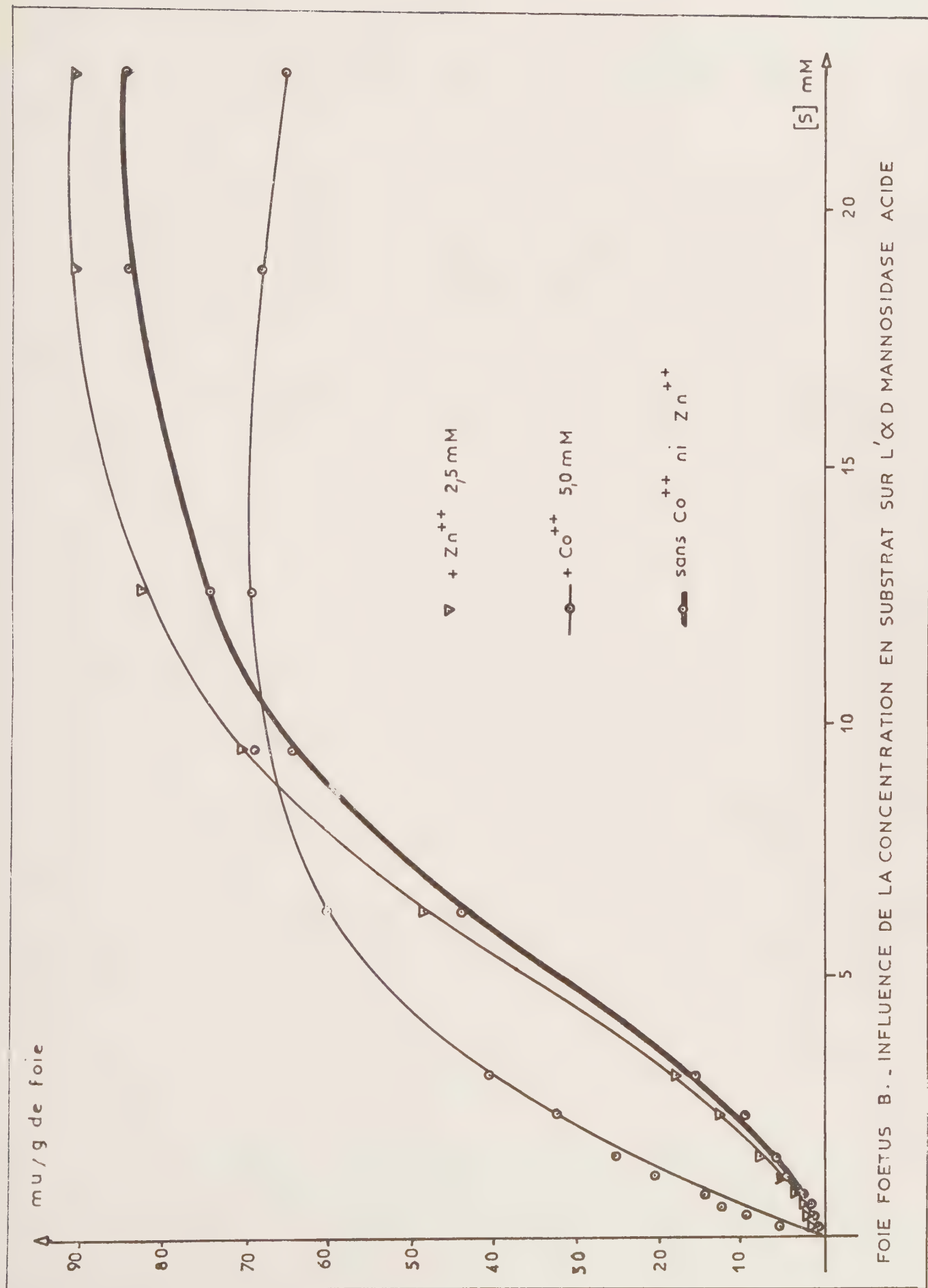


FIGURE 41



- . le cobalt 5 mM est inhibiteur : il augmente la K_m vers 1,6 mM.
- . Le zinc 2,5 mM (ou mieux 1 mM) est activateur : il diminue la K_m à 0,6 mM.

L'homogénat de foie du fœtus B présente une cinétique de type sigmoïde; il semble se comporter tout à fait comme une enzyme allostérique sur laquelle le substrat présente un effet de coopérativité homéotrope positive. La K_m apparente déterminée à partir des concentrations en substrat supérieures à 5 mM (figure 42) est de l'ordre de 30 mM.

La vitesse maximale évaluée d'après la courbe 41 est de l'ordre de 105 μ /mg ; la représentation de HILL (Figure 43) permet de calculer 3 pentes, donc 3 valeurs de n de HILL.

- . pour (S) < 1,5 mM $n = 1,27$
- . pour (S) de 2 à 13 mM $n = 2,0$
- . pour (S) de 13 à 19 mM $n = 3,3$.

(aux concentrations supérieures l'inhibition par le substrat ne permet plus le calcul du n de HILL).

- Fraction F

Elle se comporte de façon très similaire à l'homogénat ce qui n'était pas le cas pour le placenta du fœtus entre l'homogénat et la fraction V.

Fraction F seule : la cinétique est représentée par une courbe sigmoïde. La vitesse maximale estimée par la courbe $v = f(S)$ est de 1,4 μ /mg de protéines et la représentation de HILL conduit à déterminer 3 valeurs de n de HILL:

- . pour (S) < 3,1 mM $n = 1,0$
- . pour (S) 3,1 à 9,4 mM $n = 1,8$
- . pour (S) > 9,4 mM $n = 3,2$

En présence d'ions Zinc Zn^{++} 1 mM : on obtient une cinétique du même type à cela près que l'activité est stimulée à toutes les concentrations en substrat et que la vitesse maximale estimée est bien supérieure : 6,25 μ /mg

FIGURE 42

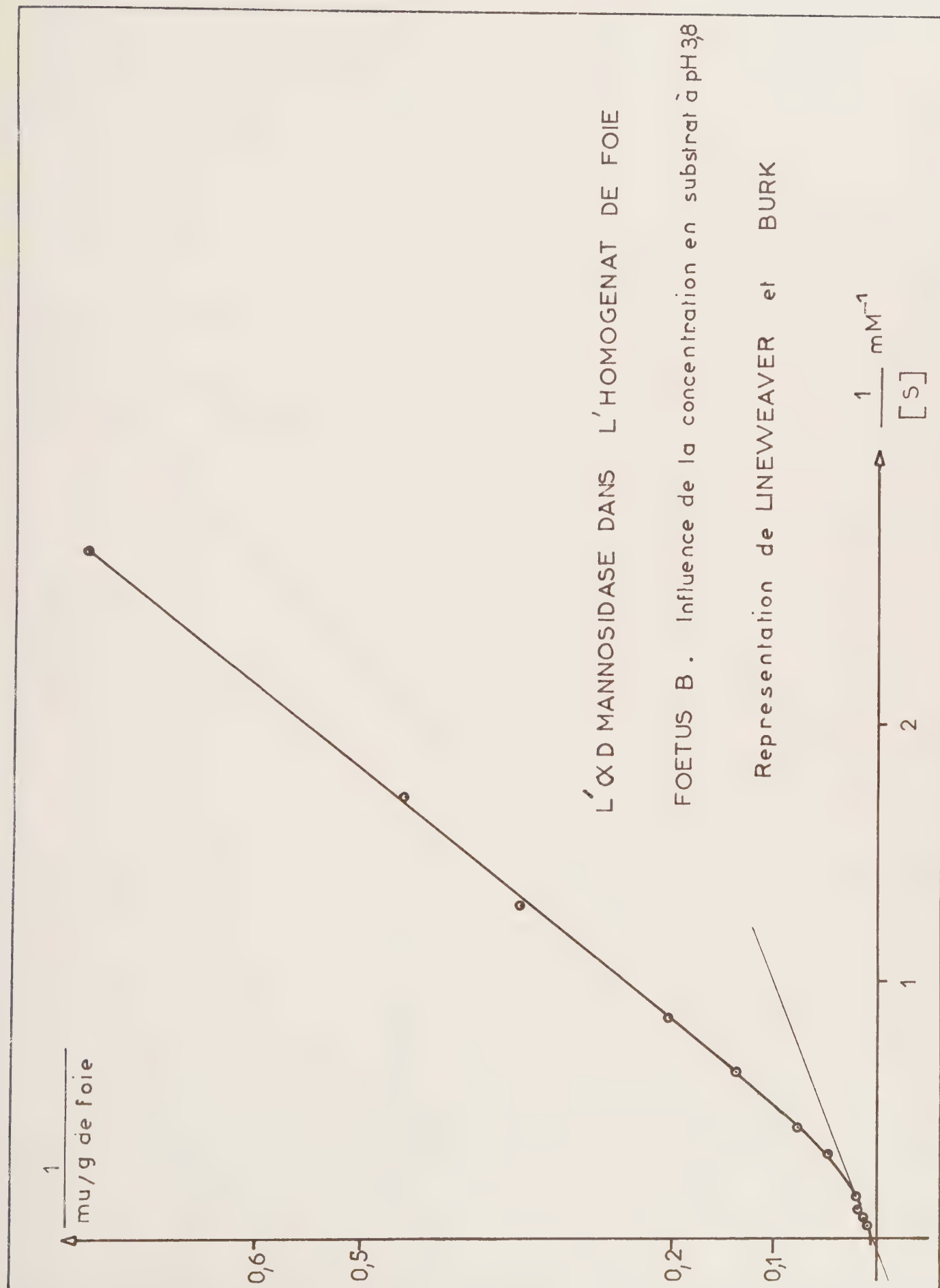
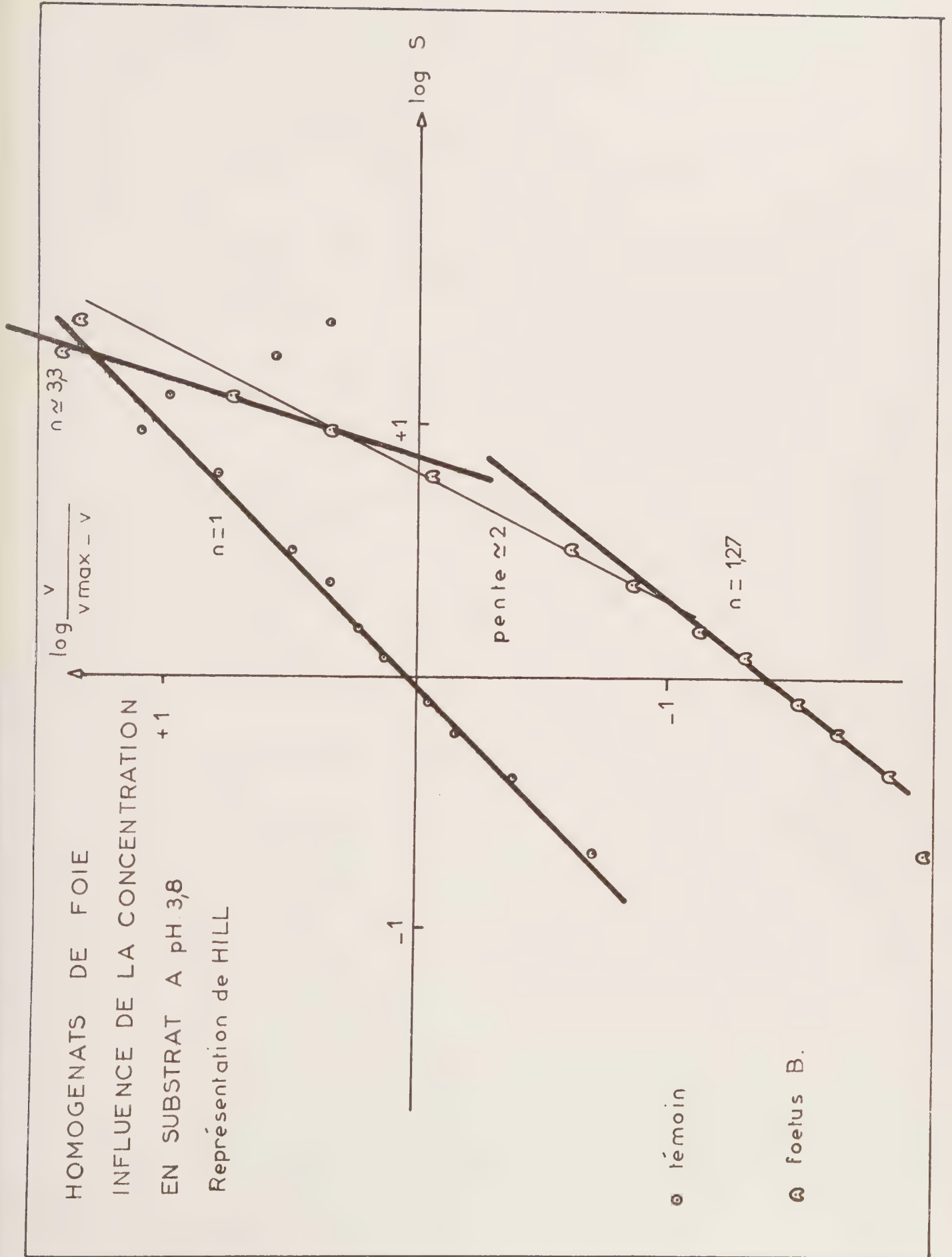


FIGURE 43



La représentation de HILL conduit à déterminer 3 valeurs du n de HILL :

- . pour (S) $< 2,3$ mM $n = 1,2$
- . pour (S) $3,1$ à $6,25$ mM $n = 2,1$
- . pour (S) $> 6,25$ mM $n = 3,1$.

En présence d'ions cobalt Co^{++} 5mM, l'activité est surtout stimulée aux faibles concentrations en substrat et la représentation de Lineweaver et Burk conduit à déterminer 2 K_m :

- . pour (S) $< 0,9$ mM $K_m = 1$ à $1,10$ mM
- . pour (S) $> 1,5$ mM $K_m = 6,3$ mM (et vitesse maximale = $7,46$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines).

La représentation de HILL permet de déterminer 2 pentes, donc deux valeurs du n de HILL :

- . pour (S) $< 2,3$ mM $n = 0,9 - 1,0$
- . pour (S) $> 3,1$ mM $n = 2$.

- Fraction A

La fraction A conduit à des résultats similaires.

L'étude de la concentration en substrat permet de mettre en évidence une cinétique représentée par une courbe sigmoïde ; la vitesse maximale estimée ainsi étant de l'ordre de $58 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines, la représentation de HILL conduit à 3 pentes :

- . pour (S) $< 1,17$ mM $n = 1,1$
- . pour (S) de $1,5$ à $6,25$ mM $n = 2$
- . pour (S) $> 6,25$ mM $n = 3,4$.

En présence d'ions Zn^{++} 1 mM, la courbe obtenue est encore similaire mais déplacée vers les activités enzymatiques supérieures et la vitesse maximale est trouvée à $92 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines. La représentation de HILL permet

de calculer 3 valeurs de n :

- . pour $(S) < 2,34 \text{ mM}$ $n = 1,2$
- . pour (S) de $2,34$ à 5 mM $n = 1,8$
- . pour $(S) > 7 \text{ mM}$ $n = 3,2$.

En présence d'ions Cobalt Co^{++} 5 mM , l'enzyme est activée surtout aux faibles concentrations en substrat où le cobalt est plus actif que le zinc. La représentation de Lineweaver et Burk, donne 2 droites permettant de calculer 2 K_m :

- . pour $(S) < 0,8 \text{ mM}$ $K_m = 1,2 \text{ mM}$
- . pour $(S) > 1,5 \text{ mM}$ $K_m = 6,3 \text{ mM}$.

La vitesse maximale étant de 83 mu/mg , la représentation de HILL permet de déterminer 2 valeurs de n :

- . pour $(S) < 9,0 \text{ mM}$ $n = 0,95$
- . pour $(S) > 9,4 \text{ mM}$ $n = 3,0$.

- Fraction B

Comme pour la fraction A l'influence de la concentration en substrat est représentée par une courbe sigmoïde de vitesse maximale estimée à $1,4 \text{ mu/mg}$ de protéine.

2 valeurs du n de HILL peuvent être déterminées :

- . pour $(S) < 3,1 \text{ mM}$ $n = 1$
- . pour $(S) > 4 \text{ mM}$ $n = 2,2$.

En présence d'ions Zn^{++} 1 mM , la fraction B est très activée à toutes les concentrations en substrat et la vitesse maximale est estimée à 7 mu/mg de protéines.

Là, 3 valeurs du n de HILL peuvent être mesurées :

- . pour $(S) < 2 \text{ mM}$ $n = 1,1$
- . pour (S) de 2 à $6,1 \text{ mM}$ $n = 1,6$
- . pour $(S) > 6,1 \text{ mM}$ $n = 2,0$.

Les ions cobalt 5 mM activent surtout l'enzyme à faible concentration où ils sont plus actifs que les ions Zn^{++} .

La cinétique obtenue ressemble à une cinétique michaelienne, et la K_m obtenue par la représentation de Lineweaver et Burk est égale à 3 mM pour toute concentration de substrat. La vitesse maximale calculée est égale à 2 μ /mg de protéines et pour les concentrations étudiées en substrats de 0,2 à 5 mM, le n de HILL est trouvé égal à 1.

Le rôle des ions Co^{++} est donc probablement de stabiliser l'enzyme sous la conformation où elle se trouve aux plus faibles concentrations.

Influence des ions Co^{++} et Zn^{++} sur L'alpha D mannosidase acide hépatique.

La figure 44 montre l'action des ions Co^{++} et Zn^{++} sur l'alpha D mannosidase hépatique acide après une inactivation de la forme neutre 1 heure à 45 ° C.

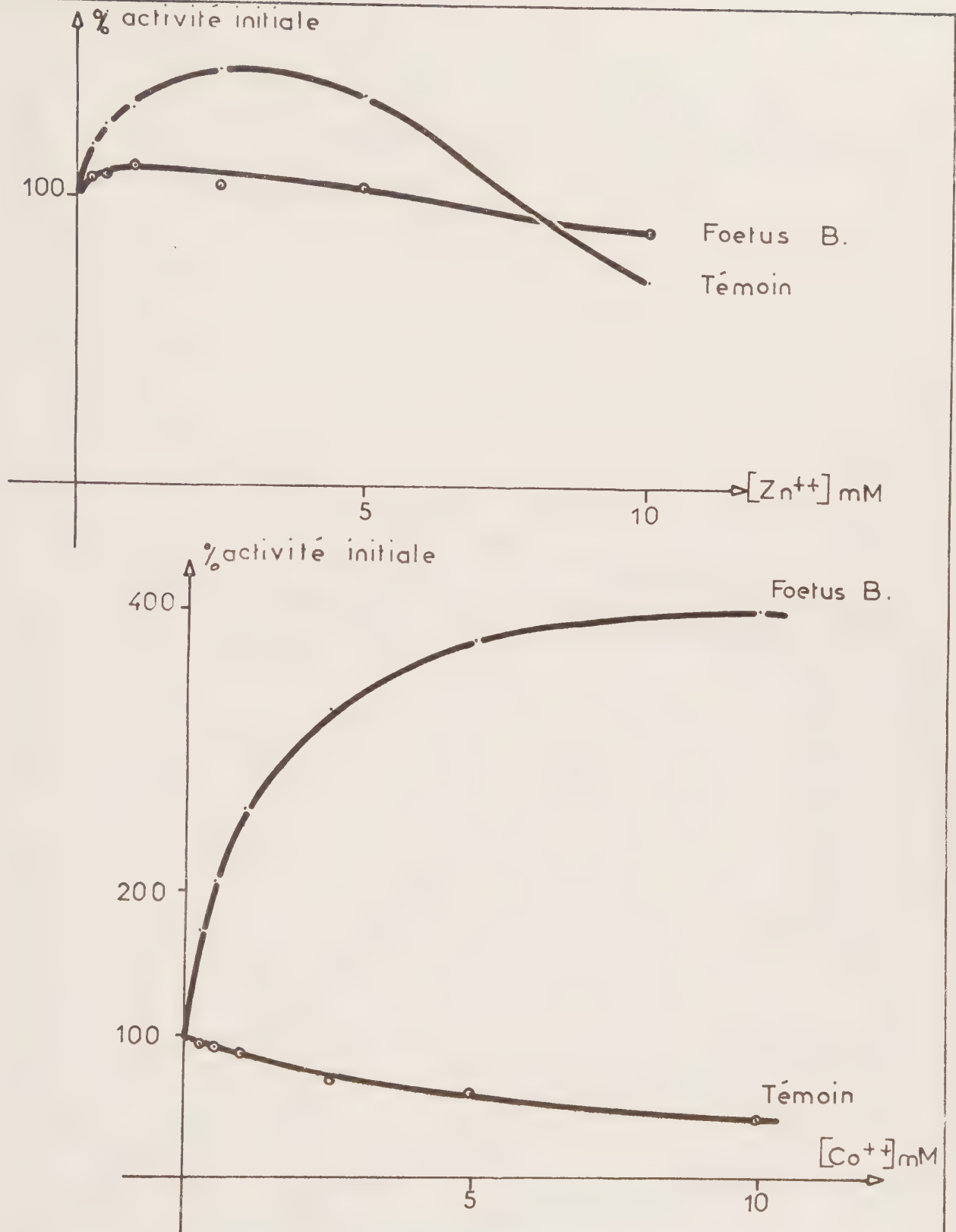
Le zinc active moins l'enzyme mutante que l'enzyme normale. Par contre le cobalt qui inactive l'enzyme normale, active beaucoup l'enzyme mutante.

Influence du mannose

Disposant d'une quantité insuffisante de foie foetal B; nous avons réalisé cette étude sur un homogénat de foie témoin et sur un homogénat d'un fragment de rein du foetus B. dans lequel nous avons vérifié (sur une courbe de pH à faible concentration en substrat le déficit de la forme acide thermostable).

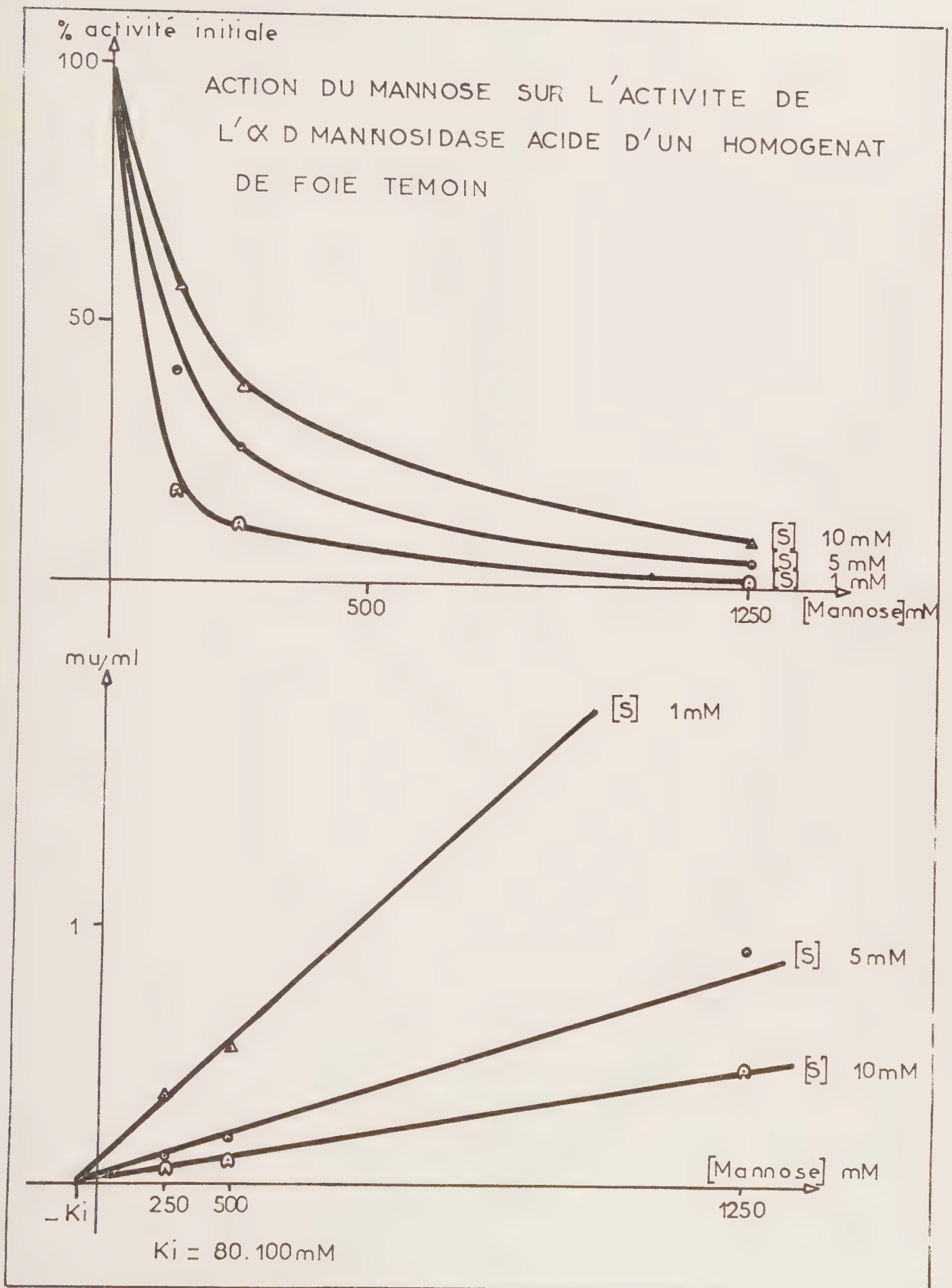
- pour le foie témoin, nous avons pu déterminer une constante d'inhibition du mannose de 80 à 100 mM (figure 45)
- pour le rein du foetus B., la constante d'inhibition trouvée est beaucoup plus élevée et de l'ordre de 1100 - 1200 mM. (figure 46).

FIGURE 44

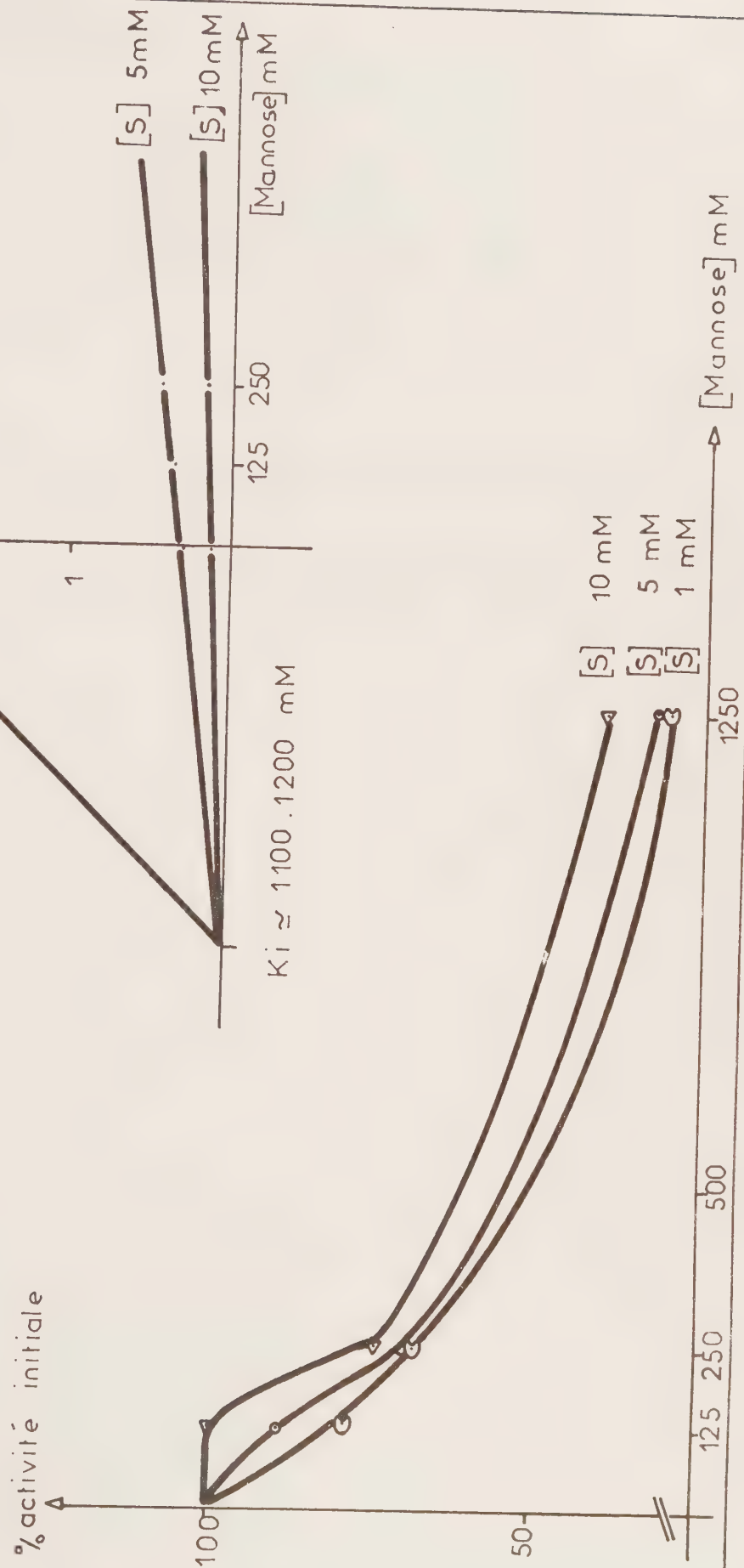


INFLUENCE DES IONS Co^{++} et Zn^{++} SUR L' α D MANNOSIDASE
HEPATIQUE A pH 3,8 POUR UNE CONCENTRATION EN SUBSTRAT
EGALE A 1mM APRES INACTIVATION DE 1H A 45°C

FIGURE 45



ACTION DU MANNOSE SUR L'ACTIVITE DE
L' α D MANNOSIDASE ACIDE DE L' HOMOGENAT
DE REIN DU FOETUS B.



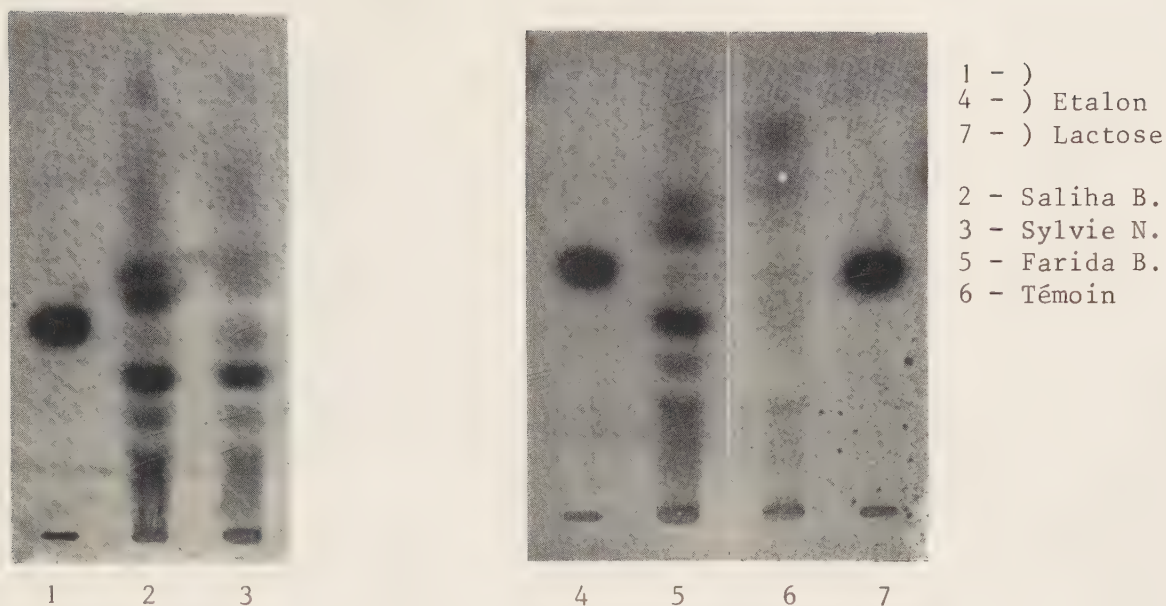
Etude électrophorétique et focalisation électrique

Si l'étude électrophorétique n'a pas permis malgré une concentration élevée en substrat (photo 5) de révéler de bandes acides de l'enzyme dans l'homogénat de rein du fœtus étudié, la focalisation électrique, elle, a permis de visualiser une telle bande (photo 6) ce qui montre bien que la forme acide de l'enzyme n'est pas absente.

II.9. - ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE DANS D'AUTRES ORGANES DU FOETUS

Etudiant l'influence du pH, nous avons vérifié le déficit de la forme acide de l'enzyme dans le cerveau et la rate du fœtus étudié.

Photo 1



Technique de screening de HUMBEL -urines

Photo 2

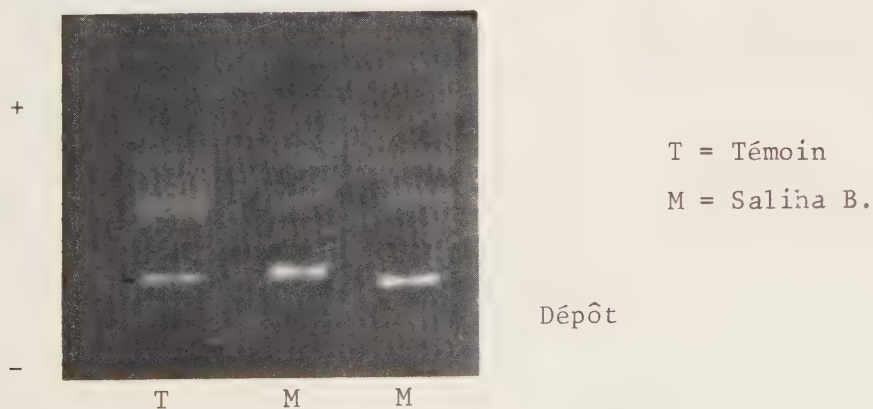


Electrophorèse Alpha D Mannosidase dans les leucocytes

(Acétate de cellulose révélation pH 4)

Phot 3

Photo 3



Electrophorèse Alpha D Mannosidase dans les fibroblastes

(Acétate de cellulose révélation pH 5)

Photo 4



I = fraction I
IV = fraction IV
A = fraction A purifiée
B = fraction B purifiée

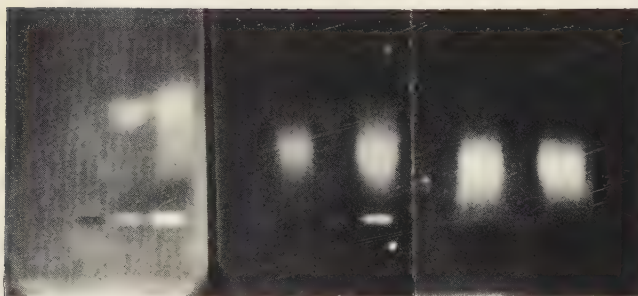
Dépôt

Electrophorèse Alpha D Mannosidase

Placenta Témoin

(Acétate de cellulose - Révélation pH 3,5)

Photo 5



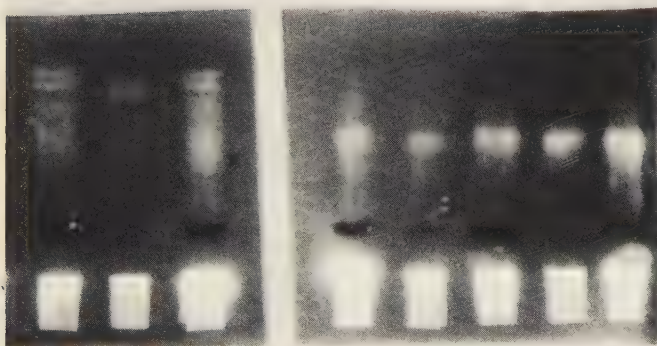
1 = Rein foetus B. inactivé
2 = Foie témoin inactivé
3 = Rein foetus B.
4 = Foie témoin

Dépôt

1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
révélation
pH 6,5 pH 4,5 pH 3,5

Electrophorèse Alpha D Mannosidase (acétate de cellulose)

Photo 6



3,5 (+)

1-3-5 = foie témoin
2-4 = foetus B

3 4 5
révélation
pH 3,5

1 2 3 4 5
révélation
pH 6,5

9,5 (-)

Focalisation Electrique
Alpha D Mannosidase

III - DISCUSSION

III.1. PROTOCOLE PROPOSE POUR ETABLIR LE DIAGNOSTIC D'UNE MANNOSIDOSE ET LA MISE EN EVIDENCE DE SON PHENOTYPE

a) L'enzyme normale

Nos résultats concernant l'enzyme normale (dont à notre connaissance il n'a pas été décrit plusieurs variants humains), sont en assez bon accord avec ceux de la littérature.

Le pH optimal, en tampon citrate-phosphate, est pour les formes acides A et B voisin de 4 (8, 13, 119, 120, 191, 243, 246).

L'étude de l'influence de la concentration en substrat à pH 3,8 - 4 nous a permis de déterminer :

- dans les leucocytes une K_m de 1,5 - 2,0 mM en bon accord avec les résultats de AVILA (8),
- dans le placenta une K_m de 1,5 - 2,0 mM également,
- dans les fibroblastes et le foie une K_m voisine de 1 mM qui correspond aux valeurs de cette constante trouvées par BEAUDET (13) dans les fibroblastes et par PHILLIPS (246) dans le foie.

L'action des effecteurs (EDTA, ions Zn^{++} et Co^{++}) corrobore celle des autres auteurs.

L'EDTA qui inhibe l'enzyme impure est sans action sur l'enzyme purifiée placentaire comme c'était le cas pour l'enzyme hépatique dans les expériences de PHILIPPS (244-246).

Nous avons constaté que les ions Zn^{++} déplacent le pH optimal des formes A et B vers la zone acide (243) et activent l'enzyme en diminuant sa K_m (71) ; ces effets ont été retrouvés dans notre étude après purification de l'enzyme placentaire alors que PHILIPPS (246) ne met pas en évidence d'effet

de ces ions sur l'enzyme hépatique purifiée (246). Ces ions auraient en outre, un effet stabilisateur sur l'enzyme (157).

Les ions cobalt Co^{++} inhibent les formes A et B en augmentant la K_m déterminée à pH 4,0, dans notre étude et dans celle de DESNICK (71) ; nous avons pu constater qu'ils déplacent le pH optimal vers les zones moins acides (243) et c'est la principale anomalie que nous avons pu mettre en évidence sur la fraction B placentaire purifiée.

L'iodoacétate, inhibiteur des groupements thiols, s'est montré sans action sur les fractions A et B de l'enzyme placentaire que nous avons purifiée. Dans les leucocytes, AVILA (8) notait l'insensibilité de l'enzyme à l'action d'un autre inhibiteur des groupements thiols le parahydroxymercuribenzoate ; par contre, dans le rein, MARINKOVIC (85) montrait une inhibition de l'alpha D mannosidase A sous l'action de ces inhibiteurs.

L'étude des points isoélectriques de la fraction placentaire B nous a permis de déterminer un pic mineur de point isoélectrique 5,45 et 2 pics importants de point isoélectrique 5,97 et 6,17 (à la température de la glace fondante). Dans le foie, PHILIPPS (243, 246) trouvait des points isoélectriques de 5,9 et 6,1 pour la forme A et 5,4 pour la forme B.

b) l'enzyme mutante

Les 64 cas décrits dans la littérature ne nous permettent pas de dégager un phénotype enzymatique homogène ni d'affirmer l'hétérogénéité de la mutation.

La plupart des études rapportées sont en effet trop incomplètes :

- sur le plan de l'étude de la structure des composés de surcharge, seul le travail de STRECKER (295) est complet : son grand intérêt est de mettre en évidence l'absence de liaison alpha-1,6-mannosyle en position terminale non réductrice ; seul le déficit en alpha 1,2 et alpha 1,3 mannosidase est donc prouvé, et il reste à s'assurer de l'existence ou non du déficit en activité alpha-1,6-mannosidase.

- sur le plan enzymatique, une seule étude à notre connaissance (123), s'est intéressée aux substrats naturels constitués par les oligosaccharides de l'urine de malades atteints de mannosidose et a porté sur l'enzyme normale. Toutes les autres études, dont la notre, ont utilisé un substrat synthétique : le 4 methylumbelliferyl alpha D mannopyranoside ; en effet, les substrats naturels sont difficiles à obtenir, et l'étude de la réaction d'hydrolyse assez longue et laborieuse ; d'autre part, les hydrolases acides ont assez peu de spécificité pour l'aglycone, et l'emploi de substrats naturels dépend d'un choix nécessairement arbitraire (toutes les glycoprotéines et oligosaccharides à mannose de l'organisme ne peuvent être testés) ; enfin, l'hydrolyse du substrat in vitro ne rend jamais exactement compte des conditions de la réactions in vivo à l'intérieur du lysosome.

Si la plupart des auteurs ont utilisé, dans leur étude, le substrat MU, le tableau 7 met en évidence l'extrême diversité des conditions opératoires.

Notre étude, qui a tenté d'être aussi complète que possible dans l'exploration de la mutation de l'enzyme avec le substrat MU a permis de mettre en évidence, chez nos malades, un certain nombre d'anomalies de l'enzyme à pH acide :

- l'étude de l'influence de la concentration en substrat nous a permis d'apporter la preuve d'anomalies cinétiques de l'enzyme mutante qui, contrairement à l'enzyme normale, ne répond plus aux hypothèses d'une cinétique de type Michaelis Menten. Des anomalies de l'affinité de l'enzyme pour le substrat avaient déjà été signalées dans le foie (117) ainsi que dans les fibroblastes (13-32-10) mais l'étude de la cinétique de l'enzyme aux faibles concentrations en substrat n'avait pas retenu l'attention de ces auteurs.

- L'action des effecteurs est anormale : si les ions Zn^{++} activent l'enzyme mutante comme l'enzyme normale, les ions Co^{++} (5mM) qui inhibent habituellement la mannosidase activent au contraire l'enzyme pathologique et même plus que les ions Zn^{++} aux faibles concentrations en substrat. D'autres effecteurs tels que les ions Mn^{++} , Mg^{++} ou Fe^{+++} activent comme le cobalt l'enzyme mutante. Leur action n'a été rapportée jusqu'ici que sur l'enzyme normale (185).

- Nous avons montré que le mannose, produit de la réaction, est un inhibiteur beaucoup moins puissant de l'enzyme altérée que de l'enzyme normale.

Nous avons retrouvé ces types d'anomalies chez nos malades dans tous les milieux étudiés (leucocytes, fibroblastes, cellules amniotiques, organes foetaux) mais avec une certaine variabilité selon les tissus.

Dans le placenta et les leucocytes, même à des concentrations élevées en substrat, l'activité enzymatique est beaucoup plus faible que celle des contrôles.

Par contre, dans le foie, les fibroblastes, et les cellules amniotiques, l'activité à concentration élevée en substrat, peut atteindre ou dépasser les valeurs des témoins.

Si l'on considère l'aspect de la courbe représentative de la cinétique enzymatique, celle-ci peut révéler un aspect franchement sigmoïdal (comme dans le foie), ou au contraire biphasique (comme dans les fibroblastes ou le placenta). La représentation de HILL permet de déterminer plusieurs pentes, donc un nombre variable de valeurs du n de HILL dans le foie et le placenta. L'action du cobalt sur la cinétique n'est pas non plus strictement identique d'un organe à l'autre et l'on peut calculer par la représentation de Lineweaver et Burk 1 (placenta) ou 2 (foie) valeurs de la K_m apparente.

L'ensemble de ces anomalies, nous a conduit à proposer un protocole pour le diagnostic et pour l'étude comparative des divers phénotypes enzymatiques avec le substrat MU.

c) Protocole diagnostic d'une mannosidose

L'anomalie enzymatique ne peut être mise en évidence qu'à pH acide (3,8 - 4) et, dans certains cas, seulement à faible concentration en substrat. Les auteurs qui n'ont pas retrouvé de déficit de l'activité enzymatique utilisaient une concentration en substrat trop élevée. (tableau 7). Si, dans ces conditions, le diagnostic reste possible dans les leucocytes ou le placenta, par contre, dans le foie, et les fibroblastes ou les cellules amniotiques cultivés, l'emploi d'une concentration en substrat trop élevée peut conduire à "manquer" totalement le diagnostic comme BEAUDET (13) et nous même (182) l'avions déjà signalé à

propos des fibroblastes. Nous gardons néanmoins à l'esprit, la possibilité de la découverte d'autres mutants à comportement différent. Dans cette optique, un seul dosage à une seule concentration en substrat est imprudente. C'est pourquoi nous proposons notre deuxième méthode pour le diagnostic de la maladie : elle prévoit une étude de l'activité enzymatique à pH 3,8 à 2 concentrations en substrat = 1 mM et 10 mM, et la détermination du rapport des 2 activités.

Dans le sérum, le problème est compliqué par l'existence d'une activité acide faible devant une activité intermédiaire importante. Les techniques de HUMBEL (129) et de MASSON (191) ont donné entre nos mains des résultats satisfaisants ; celle de HUMBEL évite l'interférence de la forme intermédiaire en déterminant l'activité à un pH très acide 3,5 et celle de MASSON en déterminant l'activité à pH moins acide mais à concentration très faible (0,8 mM) en substrat.

Nous pensons à la suite de nos résultats et de l'étude des observations de la littérature (tableau 7) que les leucocytes constituent le matériel accessible le plus fiable puisque l'activité y est normalement élevée et le déficit révélée même dans des conditions opératoires non rigoureuses en ce qui concerne la concentration du substrat. Si l'on respecte les conditions opératoires que nous venons d'énoncer, les autres milieux étudiés deviennent néanmoins tout aussi fiables.

d) Etude comparative des phénotypes

Le caractère très incomplet de beaucoup d'études de la littérature et la variabilité des conditions opératoires ne nous permettent pas de nous faire une opinion sur l'unicité ou la pluralité de la mutation.

Les essais de mise en évidence d'anomalie de la protéine par électrophorèse sur acétate de cellulose ou focalisation électrique ne nous ont pas permis (quand nous avons pu visualiser l'enzyme mutante) de mettre en évidence des anomalies de migration ; ce résultat est en bon accord avec celui de BURTON (32) qui réalise une électrophorèse en gel d'amidon. Nous insistons, ici encore, sur la nécessité d'emploi de concentrations élevées en substrat si l'on veut espérer révéler l'enzyme mutante.

III-2 - LE DIAGNOSTIC PRENATAL DE LA MANNOSIDOSE

Il pose deux problèmes :

- le problème général des activités enzymatiques dans les cellules en culture,
- le problème particulier au type d'altération enzymatique dans cette maladie.

a) Le problème général de la mesure d'activité enzymatique dans les cellules en culture.

Les fibroblastes cutanés en culture constituent le modèle d'étude "in vitro" le plus fréquent pour les maladies métaboliques. Les cellules lymphoblastoïdes constituent certes un matériel accessible qui exprime les activités alpha mannosidases acide et neutre , mais qui pose outre les problèmes généraux des cellules en culture (188) celui de l'emploi de mutagènes qui transforment ces cellules et ont pu induire des déficits enzymatiques.

Nous ne parlerons ici que des problèmes de la détermination d'activité enzymatique sur des cellules en culture non transformées. Les conditions de la culture peuvent modifier notablement, qualitativement et quantitativement, l'activité enzymatique dans les fibroblastes (119):

- le type et le pH du milieu (15, 82, 262, 336)
- la qualité et la quantité de sérum de veau foetal (en général l'activité des hydrolases augmente quand la concentration en sérum de veau foetal diminue (196)).
- la phase exponentielle ou stationnaire de la culture au moment de la récolte (les activités augmentent en phase stationnaire (196)).
- le nombre de passages (27- 76)
- les contaminations surtout inapparentes par les virus ou les mycoplasmes qui risquent de masquer un déficit (45-288).

Les études cinétiques ont pour but de rendre compte d'anomalies du site enzymatique ; ce sont là les faibles concentrations en substrat qui nous paraissent susceptibles d'apporter le maximum de renseignements ; l'action du cobalt nous paraît très intéressante dans la mesure où son pouvoir activateur est très marqué surtout à faible concentration en substrat ; l'altération du pouvoir inhibiteur du mannose nous paraît également importante à étudier.

BURTON (32) a pu mettre en évidence des cinétiques altérées des formes acides A et B dans 2 cas, et d'une seule d'entre elles dans un autre cas de mannosidose .

L'étude des variations tissulaires du phénotype de l'enzyme mutante constitue une étape nécessaire à la compréhension des processus étiopathogéniques.

Une autre voie de recherche a été ouverte par les expériences de MERSMANN (198) et PHILIPPS (245) sur les propriétés immunologiques de la protéine enzymatique.

Trois arguments nous ont autorisés à proposer un diagnostic prénatal à la mère de nos deux premiers malades, à l'occasion d'une nouvelle grossesse :

- la mise en évidence des anomalies enzymatiques que nous venons de rapporter
- leur présence constante dans les fibroblastes cutanés cultivés,
- l'existence de l'alpha mannosidase acide dans les cellules amniotiques de ponction précoce.

Ces éléments ne sont que les problèmes les plus étudiés parmi ceux qui expliquent l'extrême variabilité des activités enzymatiques d'un laboratoire à l'autre et même, d'un moment à l'autre, dans un même laboratoire (107).

Les cellules amniotiques en culture soulèvent les mêmes problèmes (33-34-89-266-338) avec encore plus d'acuité car les variations d'activité y sont encore moins régulières et conduisent à un large éventail de valeurs pour les témoins (il semble par exemple que le temps mis par les cellules pour arriver à confluence soit un facteur important et difficilement maîtrisable.) Ces difficultés expliquent tout l'intérêt de pouvoir mettre en évidence non seulement des variations quantitatives, mais aussi des variations qualitatives de l'enzyme mutante.

b) les problèmes particuliers au type d'anomalie enzymatique dans la mannosidose

- choix du milieu d'étude :

Nous avons montré que le liquide amniotique ne permettait pas le diagnostic. L'activité acide normale y est dans notre expérience extrêmement faible dans certains liquides témoins et pourrait même être parfois nulle (33). Un essai d'inactivation thermique de la forme intermédiaire (pour diminuer son interférence), n'a pas contribué à rendre ce milieu plus apte au diagnostic.

Seules les cellules amniotiques sont donc utilisables pour ce diagnostic et sont étudiées de préférence après culture pour les raisons indiquées précédemment (2ème partie I.2).

- choix des conditions d'étude :

Nous avons démontré par notre étude que le diagnostic prénatal de la maladie était possible en respectant les conditions expérimentales rigoureuses. Leur non respect risque d'entraîner l'absence de diagnostic d'un fœtus atteint..

Ce sont au minimum : l'étude de l'activité enzymatique à un pH acide voisin de 3,8 et avec une faible concentration en substrat (1 mM).

Avec une concentration plus élevée nous avons montré que l'activité risquait de paraître faussement normale. Mais il nous a paru préférable de compléter ce seul dosage : en effet, la grande variabilité des activités déterminées pour les témoins dans les conditions du diagnostic prénatal nous ont conduit à essayer de mettre en évidence les anomalies qualitatives de l'enzyme mutante :

- l'étude de l'influence du pH sur l'activité (ou au moins le rapport des activités à pH 3,8 et 5,8)

- et surtout l'étude de l'influence de la concentration en substrat (ou au moins le rapport des activités à pH 3,8 pour des concentrations en substrat 1 et 8 ou 10 mM).

Ces études ne demandent, grâce aux techniques miniaturisées telles que nous les avons décrites, que peu de matériel et apportent au résultat le maximum de fiabilité.

Nous tenons tout particulièrement à attirer l'attention sur l'importance d'une étude familiale soignée de la mutation pour éviter les difficultés d'interprétation au moment du diagnostic prénatal puisqu'il n'est pas exclu que la maladie puisse présenter une certaine hétérogénéité. Il faut s'assurer du phénotype de la mutation sur le cas index et étudier les activités résiduelles chez les hétérozygotes. En toute sécurité, il faut disposer des fibroblastes cutanés du cas index (conservés en banque cellulaire) que l'on étudie en parallèle avec les cellules amniotiques à risque et avec des cellules amniotiques témoin cultivées en même temps (qui constituent une sorte d'indice de l'activité enzymatique dans les conditions de culture à un moment donné).

III.3. DISCUSSION SUR LA NATURE DE LA MUTATION

a) Hypothèse sur la mutation à l'origine du phénotype étudié

- L'enzyme normale : Nous avons montré que l'enzyme normale (étudiée purifiée ou dans un homogénat) présente une cinétique michaelienne. La représentation de HILL conduit à déterminer une valeur du n de HILL = 1 pour toute concentration en substrat inférieure à celle où il devient inhibiteur.

L'enzyme polymérique (probablement tétramérique (186)) comporte donc un seul site ou plus probablement plusieurs sites enzymatiques de même affinité pour le substrat et n'interagissant pas entre eux (268).

Le mannose, deuxième produit de la réaction, agit comme un inhibiteur compétitif et nous avons pu calculer une constante d'inhibition $K_i = 25$ mM pour l'enzyme placentaire et une constante d'inhibition $K_i = 90$ mM pour l'enzyme hépatique. Nous suggérons donc pour cette réaction à 1 substrat et 2 produits le mécanisme réactionnel suivant :

- formation du complexe enzyme - substrat
- libération du premier produit de la réaction : la méthylumbelliférone
- puis libération du 2ème produit de la réaction : le mannose.

Il reste à nous assurer, comme nous l'avons déjà souligné, que la 4 méthylumbelliférone n'est pas un inhibiteur compétitif de la réaction.

- l'enzyme mutante résulte très probablement d'une anomalie du gène de structure de l'enzyme. Au lieu d'exister sous une seule conformation stable symétrique, l'enzyme semble pouvoir exister sous plusieurs conformations comme le laisse supposer l'aspect sigmoïde (dans le foie) ou biphasique (dans le placenta) de la cinétique ou encore les différentes valeurs obtenues pour le n de HILL (foie).

. A faible concentration en substrat, l'enzyme existerait sous une configuration de K_m peu altérée et de n de HILL $\simeq 1$; cette conformation

serait très instable (on note en effet une nette diminution d'activité de l'enzyme mutante avec le temps d'incubation dans notre expérience comme dans celle de KISTLER (157)); cette conformation ne pourrait même pas être mise en évidence dans le foie à moins d'être stabilisée par les ions cobalt Co^{++} . Les ions Co^{++} 5 mM (et peut être d'autres ions métalliques comme Mn^{++} , Mg^{++} ou Fe^{+++}) stabiliseraient l'enzyme sous cette forme où l'affinité pour le substrat est bonne mais, la V_m étant très faible, l'efficacité de l'enzyme reste limitée.

. A concentration élevée en substrat, l'enzyme se stabiliserait dans une conformation de K_m élevée pour le substrat (K'_m supérieure à 25 mM) mais d'activité catalytique plus importante (la V_m serait alors plus importante que pour l'autre forme). Il est possible aussi que l'on sature dans ces conditions d'autres sites enzymatiques de caractéristiques différentes des premiers. Dans le foie, le comportement est celui d'une enzyme allostérique sur laquelle le substrat exerce un effet coopératif positif stabilisant l'enzyme sous une forme de plus en plus favorable à la réaction enzymatique.

Dans toutes les hypothèses, les sites enzymatiques semblent interagir les uns sur les autres, et toute modification des conditions opératoires (force ionique, choix du tampon, méthode d'obtention de l'échantillon, variations de charge...) va pouvoir retentir sur le comportement de l'enzyme mutante.

A la différence des ions cobalt qui activent l'enzyme mutante à faible concentration de substrat surtout, les ions Zn^{++} 1 mM agissent de façon à peu près identique à toute concentration en substrat : Ils activent l'enzyme sous n'importe quelle conformation.

D'autre part alors que le mannose était un inhibiteur compétitif puissant du substrat pour l'enzyme normale, son action inhibitrice est beaucoup plus réduite sur l'enzyme mutante, ce qui rend bien compte de la perturbation au niveau de la fixation du substrat au site enzymatique.

Nous avons d'autre part, signalé que la mutation n'affecte pas identiquement l'activité dans tous les tissus (cas du placenta et des leucocytes d'une part où l'enzyme normale présente une K_m de l'ordre de 1,5 - 2 mM et

cas du foie et des fibroblastes d'autre part où l'enzyme normale présente une K_m voisine de 1 mM). A l'appui des variations de l'enzyme mutante que nous avons constaté dans les divers tissus, MERSMANN (193-194) a suggéré que l'enzyme pouvait être constituée de sous-unités en partie différentes ou en proportions différentes dans les divers organes.

Nous pensons, en outre, que d'autres explications pourraient être recherchées dans l'existence "in vivo" d'activateurs de cette hydrolase acide qui pourraient différer d'un organe à l'autre. Enfin, cette enzyme est une glycoprotéine susceptible, comme telle, d'une certaine microhétérogénéité surtout d'un organe à l'autre.

Le fait qu'en présence de fortes concentrations de substrat, l'enzyme hépatique peut manifester une activité normale ou supérieure à la normale explique peut être que l'hépatomégalie n'évolue pas ou peu, ou même regresse spontanément.

Il serait intéressant d'étudier dans cette optique, l'alpha D mannosidase cérébrale mutante pour déterminer si, comme dans le foie elle est susceptible d'atteindre une activité normale à forte concentration en substrat, ou si, au contraire, comme dans les leucocytes, ou dans le placenta, elle reste toujours très diminuée : il pourrait y avoir là un début d'explication à la faible atteinte hépatique dans la maladie et à l'importance de la débilité mentale toujours évolutive.

b) Sécrétion par les fibroblastes mutants d'enzyme normale dans le milieu de culture

(nos résultats et HULTBERG 127-128). Nous en avons recherché une première explication dans la présence dans le milieu de culture de nombreux oligoéléments (ions métalliques en particulier) ; hors nous avons concentré ce milieu pour étudier l'enzyme et il est possible d'envisager alors une stabilisation de l'enzyme sous une forme active à faible concentration en substrat ; mais l'enzyme était normale à la fois en ce qui concerne l'affinité pour le substrat et la vitesse réactionnelle (ce qui n'avait jamais été obtenu avec les effecteurs étudiés), et les ions Zn^{++} 1 mM et Co^{++} 5 mM provoquaient les mêmes effets que sur l'enzyme normale. Il nous reste seulement, pour affirmer une identité de

comportement de cette enzyme avec celle secrétée par les fibroblastes normaux, à vérifier les résultats de l'étude de l'inhibition par le mannose : l'enzyme sécrétée par les fibroblastes mutants nous a paru un peu moins sensible à son action.

L'hypothèse avancée par HULTBERG (128) d'une anomalie enzymatique du type mucopolysaccharidose nous a paru improbable. Elle n'explique pas l'absence d'augmentation de l'activité de l'enzyme dans le sérum et ni pourquoi l'enzyme intra-cellulaire présente des propriétés enzymatiques altérées et l'enzyme extracellulaire des propriétés enzymatiques apparemment normales (phénomène qui n'est pas constaté dans les mucopolysaccharidoses où le fonctionnement de l'enzyme n'est pas perturbé et identique à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule).

Nous pensons néanmoins qu'une anomalie structurale touchant à la fois le site enzymatique et le site de reconnaissance de l'enzyme spécifique des fibroblastes (d'autres sites de reconnaissance pouvant être impliqués dans les autres tissus) ne peut pas être exclus.

Des études immunologiques et enzymatiques couplées devraient nous permettre de savoir si l'activité normale secrétée par les fibroblastes mutants est due à une quantité normale ou augmentée de protéines ; les anticorps contre la mannosidase acide normale pourraient être utilisés à condition que les sites immunologiques de la protéine mutante ne soient pas altérés comme le laisse supposer la présence de "cross reacting material" chez les malades (198) ; des expériences de PHILLIPS (247) dans la mannosidose bovine font toutefois discuter l'intégrité du site immunologique.

c) Implications thérapeutiques

Si aucune explication définitive ne peut être apporté aujourd'hui à ce phénomène surprenant, la possibilité pour l'enzyme synthétisée par les cellules mutantes de se comporter de façon similaire à l'enzyme normale dans certaines circonstances, mérite d'être explorée en vue de la recherche de possibilités thérapeutiques.

En effet, les essais thérapeutiques tentés jusqu'alors n'ont pas été satisfaisants, ni les essais de stimulation de l'enzyme par les ions Zn^{++} , ni

la réalisation d'une greffe in utero par transplant d'une chimère de son jumeau sain à un veau atteint de mannosidose. L'hypothèse d'anomalies des sites de reconnaissance suggérée par HULTBERG (128) n'ouvre pas pour l'instant l'espoir d'autres possibilités thérapeutiques.

La meilleure solution envisageable est la stabilisation et l'activation de l'enzyme mutante : les thérapeutiques substitutives n'ont pour l'instant jamais pu atteindre le système nerveux central. Nos études montrent que le cobalt aurait peut être sur l'enzyme mutante plus d'efficacité que le zinc.

En l'absence de toute thérapeutique efficace, la seule ressource actuellement offerte aux familles à risque est le diagnostic prénatal dont notre travail a démontré la possibilité.

CONCLUSION

Dans le cadre de l'intérêt que nous portions à certaines maladies de surcharge lysosomiale et aux mécanismes enzymatiques à leur origine, nous avons été amenée à nous intéresser plus spécialement à la mannosidose.

Malgré le nombre des observations déjà publiées, (64 cas), les anomalies enzymatiques décrites étaient incomplètes et il nous a paru important de les approfondir.

Comparativement au mécanisme d'action de l'alpha mannosidase normale, notre but a été de préciser les altérations enzymatiques dans la mannosidose afin de dégager le phénotype enzymatique mutant ; les anomalies que nous avons mis en évidence concernent :

- les propriétés cinétiques de l'alpha mannosidase (affinité pour le substrat 4 MU et vitesse de la réaction),
- l'action d'effecteurs ioniques (Zn^{++} , Co^{++}),
- et l'effet du mannose (produit normal de la réaction).

Sur ces données nous avons proposé un certain nombre d'hypothèses explicatives de l'anomalie structurale de la protéine enzymatique en particulier, nous suggérons la possibilité de son existence sous plusieurs conformations, variables selon les tissus, et susceptibles d'être modifiée par divers facteurs.

Notre expérience des milieux biologiques étudiés nous a amenée à proposer un protocole diagnostique de la mannosidose :

Dans la mesure où une oligosaccharidurie est mise en évidence, le diagnostic enzymatique pourra se faire dans diverses cellules ou liquides biologiques ; ceux qui se prêtent bien au diagnostic sont : les leucocytes, et

dans des conditions bien définies de concentration en substrat , les fibroblastes et les cellules amniotiques en culture, ainsi que le tissu hépatique ; le sérum peut, selon les techniques proposées par HUMBEL et MASSON donner des résultats fiables.

Les conditions expérimentales comportent la nécessité de travailler non seulement comme il est classique en enzymologie courante dans des conditions saturantes en substrat, mais aussi avec des concentrations plus basses qui permettent souvent une meilleure discrimination des mutants.

Les possibilités thérapeutiques actuelles de la mannosidose sont inexistantes ; nos expériences portant sur l'effet favorable du cobalt in vitro, nous ont amené à suggérer une possibilité thérapeutique par le cobalt ; son effet reste néanmoins à démontrer in vivo.

Ce vide thérapeutique actuel, et l'évolution de la maladie vers une débilité mentale font proposer actuellement son diagnostic prénatal comme seul "palliatif".

Nous avons pour la première fois réalisé ce diagnostic ; il a objectivé un foetus atteint, et les anomalies enzymatiques ont été contrôlées. Nous fournissons ainsi la preuve de la possibilité du diagnostic prénatal de la mannosidose ; celle-ci avait été suggérée auparavant par la mise en évidence de l'alpha mannosidase acide dans les cellules amniotiques à un stade précoce de développement foetal.

Un certain nombre de points restent cependant à élucider :

- il reste à établir la structure des protéines enzymatiques normales et mutantes.

- Le phénotype enzymatique mutant que nous avons décrit n'est peut-être pas le seul existant ; une hétérogénéité génétique ne peut être exclue actuellement et il faudrait rechercher en particulier l'existence de mannosidoses résultant d'anomalies de l'activité alpha 1,6 mannosidase (les seules anomalies structurales découvertes ne prouvent que le déficit d'hydrolyse des liaisons alpha 1-2 et alpha 1-3).

- enfin, les tentatives thérapeutiques doivent être poursuivies à notre sens vers une modification de l'enzyme mutante puisque les fibroblastes mutants se montrent capables in vitro de sécréter une mannosidase à comportement cinétique apparemment normale.

RESUME

La mannosidose est une maladie de surcharge lysosomiale du groupe des glycoprotéinoses. Elle est caractérisée sur le plan biologique par l'accumulation tissulaire et l'élimination urinaire accrue d'oligosaccharides riches en mannose dues à l'anomalie de fonctionnement de l'alpha D mannosidase.

Le but de ce travail a été d'étudier cette hydrolase dans 4 cas de mannosidose appartenant à 2 familles afin de préciser les mécanismes enzymatiques responsables.

La première partie est consacrée à des rappels sur le métabolisme des glycoprotéines, sur les connaissances de l'alpha mannosidase et de son rôle au sein des lysosomes ; puis nous considérons la mannosidose en tant qu'anomalie du métabolisme des glycoprotéines et après l'avoir replacée au sein des maladies de surcharge lysosomiale, nous faisons le point sur les connaissances actuelles de cette maladie. De l'analyse de 64 cas de la littérature et de nos 4 cas personnels, nous tentons de dégager la personnalité de la maladie sur le plan clinique, radiologique, hématologique, anatomo-pathologique, chimique et enzymatique ; puis nous examinons les possibilités thérapeutiques actuelles des maladies de surcharge lysosomiale. Enfin, nous envisageons l'aide apportée à l'étude de cette maladie par l'existence d'un modèle animal : la mannosidose du veau Angus.

Dans la deuxième partie nous exposons notre travail personnel. Celui-ci comporte l'étude de l'alpha D mannosidase dans divers milieux biologiques normaux et pathologiques, directement ou après purification. Les sources enzymatiques testées sont :

- le sérum,
- les leucocytes,
- les fibroblastes cutanés et leur milieu de culture,
- le liquide et les cellules amniotiques,
- le placenta ,
- et le foie foetal.

Les anomalies concernent :

- l'affinité de l'enzyme pour le substrat MU et la vitesse de la réaction,

- l'action d'effecteurs ioniques (Zn^{++} et surtout Co^{++}),
- l'action du mannose.

Par contre le comportement électrophorétique de l'enzyme mutante, s'est révélé normal.

Ces résultats nous ont permis :

- de proposer un protocole de diagnostic de l'anomalie enzymatique dans la maladie (nous avons mis en évidence le rôle discriminant des faibles concentrations en substrat MU),
- et de dégager un phénotype de l'enzyme mutante dans la mannosidose.

Le comportement enzymatique de la protéine mutante nous a amenée à proposer des hypothèses explicatives sur la nature de la mutation : la mannosidase, enzyme polymérique, pourrait dans cette mutation exister sous plusieurs conformations dont la stabilité dépend de l'environnement (concentration en substrat, présence d'ions...) ; la faible inhibition de l'enzyme par son produit de réaction, le mannose, rend également compte de l'anomalie du site actif. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence une hétérogénéité tissulaire de l'enzyme.

Nous avons aussi confirmé que les fibroblastes mutants se montrent capable "in vitro" de sécréter une mannosidase apparemment normale. Ce fait demande à être démontré "in vivo" ; il en découlerait en effet une possibilité thérapeutique. Au même titre, l'action apparemment favorable "in vitro" des ions cobalt Co^{++} sur l'enzyme mutante demanderait une confirmation "in vivo".

Actuellement, aucune thérapeutique ne s'étant montré efficace pour éviter l'évolution de la maladie vers la débilité mentale, la seule possibilité n'est que "palliative" par le diagnostic prénatal dans les familles à risque. Nous avons, pour la première fois, démontré la possibilité de ce diagnostic prénatal. Nous avons établi les conditions expérimentales de sa réalisation, et nous avons ainsi évité dans notre première famille la naissance d'un troisième enfant atteint de mannosidose.

SUMMARY

Mannosidosis is a glycoproteinosis group lysosomal storage disease. The disease is characterized by tissue accumulation and increase excretion of mannose-rich oligosaccharides secondary to an alpha D mannosidase deficiency.

The aim of this work was to precise the enzymatic mechanisms responsible of the disease in 4 patients with mannosidosis from two families.

The first part dealt with glycoprotein metabolism, with alpha D-mannosidase and its role in the lysosomes ; then, mannosidosis was considered as a defect of glycoprotein metabolism ; its place within the lysosomal storage diseases was considered and the current literature on the subject was reviewed. From the study of the 64 cases in the literature and 4 personal cases, we tried to describe the disease clinically, radiologically, hematologically, anatomopathologically, chemically and enzymatically ; then, the therapeutic attempts for lysosomal storage diseases were reported. Then, the role of the animal model (Angus calf mannosidosis) in the study of this disease was reviewed.

In the second part, our personal work was reported. It involved study of alpha D-mannosidase in different biological tissues of fluids, normal or deficient, in crude or purified fractions. The mediums tested were :

- serum
- leucocytes
- cultivated skin fibroblasts and their culture medium
- amniotic fluid and cells
- placenta
- and fetal liver.

The abnormalities noticed were :

- The enzyme affinity for MU Substrate and the rate of reaction.
- The effect of ions Zn^{++} and Co^{++}
- The effect of mannose.

In contrast, the electrophoretic pattern of mutant enzyme was found normal.

These results led us :

- To propose a diagnostic approach to enzyme deficiency in this disease (we emphasize the good discrimination given by use of low MU Substrate concentrations).

- and to describe a phenotype of mutant enzyme in mannosidosis.

The enzymatic behaviour of mutant protein led us to suggest an explanation on the mutation involved : the mannosidase, polymeric enzyme, could exist on several conformations the stability of which depending on substrate and ionic environment ; the low product of reaction (mannose) inhibition fitted well with active site anomaly. Besides, we could show an enzyme tissular heterogeneity.

We also confirmed that mutant fibroblasts were able to secrete "in vitro" an apparently normal mannosidase. This has-still to be demonstrated "in vivo" ; indeed, it would lead to a therapeutic possibility. The apparently beneficent effect of Co^{++} ions on mutant enzyme "in vitro" should also be confirmed "in vivo".

Presently, as no therapeutic attempt has proven effective in the prevention of the evolution towards mental retardation, the only possibility left is the antenatal diagnosis in high risk families. For the first time, the possibility of such an antenatal diagnosis has been demonstrated. The experimental conditions to its realisation have been established and we have been able to prevent the birth of a third affected child in our first family.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AGRAWAL KML, BAHL O.P.,
Glycosidases of phaseolus vulgaris
J. Biol. Chem., 1968, 243, 103-111
- 2 - ARBISSER A., MURPHREE A.L., GARCIA C., HOWELL R.
Ocular findings in mannosidosis
Amer. J. Ophtalmol. 1976, 82, 3, 465-469
- 3 - ARBISSER A.
Mannosidosis and maternal penicillamine therapy
Lancet 1976, 1, 312-313
- 4 - ARONSON NN.
Degradation of glycoproteins by lysosomal enzymes
in Glycoproteins
GOTTSCHALK A. - 1972, 1211-1227
Elsevier Publishing Company - Amsterdam.
- 5 - AUTIO S., NORDEN N.E., OCKERMAN P.A., RIEKKINEN P., RAPOLA J., LOUHIMO T.
Mannosidosis : clinical, fine structural and biochemical findings in
Three cases.
Acta Paediatr. Scand. 1973, 62, (6), 555-565.
- 6 - AUTIO S.
Mannosidosis. A report of six cases.
Teratology, 1974, 10, 306
- 7 - AUTIO S.
Letter : Clinical features of mannosidosis
J. Pediatr. 1975, 86, (2) 314
- 8 - AVILA J.L., CONVIT J.
Characterization and properties of alpha-D-mannosidase of human poly-
morphonuclear leucocytes.
Clin. Chim. Acta, 1973, 47, (3), 335-345

- 9 - AYLSWORTH A., TAYLOR H., STUART C., THOMAS G.
Mannosidosis. Phenotypes of a severely affected child and characterization of alpha-mannosidase activity in cultured fibroblasts from the patient and his parents.
J. Pediat. 1976, 88, 5, 814-818
- 10 - BACH G. KOHN G., LASCH E.E., EL MASSRI M., LEGUM C., COHEN M.M.
A new variant of mannosidosis with residual enzymatic activity
Human Heredity, 1977, 27, 3, 163
- 11 - BARTHOLOMEW B.A., PERRY A.J.L.
Alpha mannosidase activity in synovial fluid
Acta Rheumatol. Scand., 1970, 16, (4), 304-310
- 12 - BEAUDET A.L., NICHOLS BL.Jr.
Diagnosis of alpha mannosidase deficiency.
Pediatr. Res. 1975, 9, 311
- 13 - BEAUDET A., NICHOLS B.
Residual altered alpha mannosidase in human mann sidosis
Biochem. Biophys. Res. Commun, 1976, 68, 1, 292-299
- 14 - BEHRENS N.H.
in Biology and Chemistry of eucaryotic cell surfaces
Lee E.Y.C. et Smith E.E. Ed., 1974, 155-180
Academic Press - New York
- 15 - BENKE J.D., HEBERT A., HERRICK N.
In vitro effects of magnesium ions on mutant cells from patients with Lesh-Nyhan syndrome
N. Engl. J. Med. 1973, 289, 446-447
- 16 - BERGMAN A., MANKOWSKI T., CHOJNACKI T., DE LUCA LM., PETERSON E., DALLNER G.
Glycosyl transfer from Nucleotide sugars to C85 and C55 polyprenyl and retinylphosphate by microsomal subfractions and golgi membranes of rat liver.
Biochem. J. 1978, 172, 123-127
- 17 - BERGSMA D.
Enzyme therapy in genetic diseases
In Birth Defects : original article series
Bergsma D. Ed., 1973, 9, 2
The Williams and Wilkins Company Publishers.

- 18 - BERNLOHR RW.

In Birth defects : original articles series
Bergsma Ed., 1973, 9, 2, 11-13
Williams and Wilkins Company Publishers.

- 19 BEUTLER F., KUHL W.

The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier states
by demonstration of deficiency of beta glucosidase activity in peripheral
blood leukocytes.
J. Lab. Clin. Med., 1970, 76, 747-755

- 20 - BEUTLER E., KUHL W.

Biochemical and electrophoretic studies of alpha galactosidase in normal
man, in patients with Fabry's disease and in Equidae.
Amer. J. Hum. Genet., 1972, 24, 237-249

- 21 - BEUTLER E., DALE G.L., GUINTO E., KUHL W.

Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease : preliminary trial of a
new enzyme preparation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 10, 4620-4623

- 22 - BOERSMA A., LAMBLIN G., ROUSSEL P., DEGAND P., BISERTE G.

Mise en évidence d'une activité d'endo Beta N acetylglucosaminidase dans le
foie humain.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1976, 281, 1269-1272.

- 23 - BOOTH C.W., NADLER H.L.

Radiologic and biochemical abnormalities in mannosidosis
Pediatr. Res., 1975, 9, 312.

- 24 - BOOTH C., CHEN K., NADLER H.

Mannosidosis. Clinical and biochemical studies in a family of affected
adolescents and adults.
J. Pediatr. 1976, 88, 5, 821-824

- 25 - BOSMANN H.B., HEMSWORTH B.A.

Intraneural glycosidases II. Purification and properties of alpha-fucosidase,
Beta fucosidase, alpha-mannosidase and Beta-xylosidase of rat cerebral cortex
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 242, 1, 152-171

- 26 - BOSMANN H.B.

Identification, purification and characteristics of glycosidases of human
blood platelets.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 258, 265-273

- 27 - BOSMANN H.B., GUTHEIL L. , CASE K.R.
Loss of a critical protease in ageing WI - 38 cells.
Nature, 1976, 261, 499-501
- 28 - BROTH F.E., GLASER J.H., ROOZEN K.J., SLY W.S., STAHL P.D.
In vitro correction of deficient human fibroblasts by beta glucuronidase
from different sources.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 57, 1-8
- 29 - BRUN A., HULTBERG B.
Regional study of acid hydrolases and lysosomal membrane properties
in the normal human at various ages.
Mechanisms of Ageing and development, 1975, 4, 201-213.
- 30 - BRUNNGRABER E.G.
Mannosidosis and Fucosidosis
J. Paediatr., 1970, 77, 1, 166-169
- 31 - BUDDECKE E.
Occurrence in animals and plants
in glycoproteins part A.
Gottschalk Ed. 2e édition 1972, ch p. 5. Section 2, 542-564
Elsevier Publishing Company
- 32 - BURTON B.K., NADLER H.L.
Mannosidosis : separation and characterization of 2 acid alpha
mannosidase forms in Mutant Fibroblasts.
Enzyme, 1978, 23, 29-35
- 33 - BUTTERWORTH J., SUTHERLAND G.R., BAIN A.D., Mc CRAE W.M.
Lysosomal enzymes in amniotic fluid
Clin. Chim. Acta, 1972, 39, 1, 275-276.
- 34 - BUTTERWORTH J., SUTHERLAND G.R., BROADHEAD D.M., BAIN A.D.
Lysosomal enzyme levels in human amniotic fluid cells in tissue culture III.
beta glucuronidase, N acetyl beta D glucosaminidase, alpha mannosidase and
acid phosphatase.
Clin. Genet., 1974, 5, 4, 356-362

- 35 - BUTTERWORTH J., SUTHERLAND G.R., BROADHEAD D.M., BAIN A.D.
Effect of serum concentration, type of culture medium and pH on the
lysosomal activity of cultured human amniotic fluid cells.
Clin., chim. acta, 1974, 53, 239-244
- 36 - CARLIN R., COTLIER E.
Glycosidases of the crystalline lens I
Invest. Ophtalmol., 1971, 10, 887-897
- 37 - CARLIN R., COTLIER E.
glycosidases of the crystalline lens II
Invest. Ophtalmol., 1971, 10, 11, 898-903
- 33 - CARROLL M., DANCE N., MASSON P.K., ROBINSON D., WINCHESTER B.
Human mannosidosis - The enzyme defect
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 49, 2, 579-583
- 39 - CHABAUD O., BOUCHILLOUX S., FERRAND M.
Characterization, isolation and properties of thyroid glycosidases : beta
galactosidase, beta-N-acetylglucosaminidase and alpha mannosidase.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 227, 1, 154-176
- 40 - CHAMPION M.J., SHOWS T.B.
Mannosidosis : assignment of the lysosomal alpha mannosidase Beta gene
to chromosome 19 in man.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 7, 2968-2972.
- 41 - CHERON J.M., RAHIMULA P., COURTOIS J.E., TRUHAUT R.
Alpha mannosidase activity of different human biological fluids.
C.R. Acad. Sci. D (Paris), 1975, 280, 20, 2393-2396.
- 42 - CHESTER M.A., LUNDBLAD A., MASSON P.K.
The relationship between different forms of human alpha-mannosidase
Biochim. Biophys. Acta, 1975, 391, 2, 341-348.
- 43 - CHRISTOMANOU H., ČÁP C., SANDHOFF K.
Isoelectric focusing pattern of acid hydrolases in cultured fibroblasts,
leucocytes and cell free amniotic fluid.
Neuropädiatrie 1977, 8, 3, 238-252

- 44 - CHU C.Y., TURNER H.D.
Purification of alpha D Mannosidase from jack-bean meal suitable for use as reagent.
Biochem J., 1974, 139, 2, 469-471.
- 45 - CLARK A.F., FARRELL D.F. et SCOTT C.R.
The effect of mycoplasma contamination on the in vitro assay of pyruvate deshydrogenase activity on cultured fibroblasts.
Clin. Res., 1976, 24, 147 A (Abstr.)
- 46 - COHEN C.M., WEISSMANN G., HOFFSTEIN S., AWASTHI Y.C., SRIVASTAVA S.
Introduction of purified hexosaminidase A in Tay-sachs leukocytes by means of immunoglobulin coated liposomes
Biochemistry, 1976, 15, 2, 452-460
- 47 - COHN Z.A., FEDORKO M.E.
The formation and fate of lysosomes
in Lysosomes in Biology and Pathology
Dingle J.T. and H.B. Fell Ed., 1969, vol. 1, p. 43-63
Amsterdam : North Holland Publishing Company
- 48 - CONCHIE J., MAY A.J.
Mammalian glycosidases.
IV - The intracellular localisation of Beta-galactosidase, alpha mannosidase, Beta N-acetyl glucosaminidase and alpha-L-fucosidase in mammalian tissues.
Biochem. J., 1963, 87, 354-361
- 49 - COSSON A., JANVIER D.
Cytologie hématologique de la mannosidose et de l'I cell disease
dans "Les oligosaccharidoses"
Farriaux J.P., 1977, 115-118
Crouan et Roques Ed. Lille.
- 50 - COURTOIS J., MANGEOT M.
Study of alpha-mannosidase of human blood serum, its activation by cobalt.
C.R. Acad. Sci. D (Paris), 1970, 270, 22, 2727-2728

- 51 - COURTOIS J.E., MANGEOT M.
Some characteristics of serum alpha-mannosidase. Its activation by cobalt salts.
Ann. Biol. Clin., 1972, 30, 1, 49-58
- 52 - CUISINIER D.
Coût / Bénéfice du diagnostic prénatal des maladies métaboliques.
Thèse Pharmacie - Lyon, 1977
- 53 - CZICHI W., LENNARZ W.J.
Localization of the enzyme system for glycosylation of Proteins via the lipid-linked pathway in rough endoplasmic reticulum
J. Biol. Chem., 1977, 252, 22, 7901-7904
- 54 - DALE G.L., VILLACORTE D.G., BEUTLER E.
High yield entrapment of proteins into erythrocytes.
Biochemical medecine, 1977, 18, 220-225
- 55 - DAVIES M.
the heterogeneity of lysosomes
in Lysosomes in Biology and Pathology
Dingle J.T., et Dean R.T. Ed., 1975, 4, chap. 12, 305-348
Amsterdam : North Holland Publishing Company
- 56 - DAVIES P., ALLISON A.C.
The secretion of lysosomal enzymes
in Lysosomes in Biology and Pathology
Dingle J.T. et Dean R.T. Ed., 1976, 5, 61-98
Amsterdam : North Holland Publishing Company
- 57 - DEAN R.T.
Multiple form of lysosomal enzymes
in Lysosomes in Biology and Pathology
Dingle J.T. et Dean R.T. Ed., 1975, 13, 349-382
North Holland Publishing Company,
- 58 - DE BARSY Th., VAN HOOFF F.
Enzyme replacement therapy with purified human acid alphasglucosidase in type II glycogenosis.
in Enzyme therapy in lysosomal storage diseases.
Tager J.M., Hooghwinkel G.J.M., Daems W.Th. Ed., 1974, 277-279
North Holland Publishing Company

- 59 - DE BOECK S., STOCKX J.
Alpha mannosidase in the hen's egg yolk
Arch. Int. Physiol., 1974, 82, 5, 976-977
- 60 - DE DUVE C.
Les lysosomes
La Recherche, 1974, 5, 49, 815-826
- 61 - DELOACH J., PETERS J., PINKARD O., GLEW R., IHLER G.
Effect of glutaraldehyde treatment of enzyme-loaded erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 1977, 481, 507-515
- 62 - DEMAINE A.L., INAMINE E.
Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase
(alpha-D-mannosidase) formation.
Bacteriol. Rev., 1970, 34, 1, 1-19
- 63 - DEN TANDT W.R.
Acid hydrolases in uncultured amniotic fluid cells
Clin. Chim. Acta, 1972, 40, 1, 199-204
- 64 - DEPORTER D.P.
Microtubules, cyclic AMP and lysosomal enzyme release - A review
Biomedecine, 1978, 28, 5-9
- 65 - DE PRIJCKER J., VERVDORT A., DE BRUYNE R.
Purification and properties of alpha-D-mannosidase from medicago sativa L.
Eur. J. Biochem, 1974, 47, 3, 561-566
- 66 - DE PRIJCKER J.D., DE BRUYNE C.K., KERSTERS HILDERSON H.
Proceedings : influence of Zn^{2+} and pH on the stability and activity of
alpha D mannosidase from medicago sativa L.
Arch. Int. Physiol. Biochim., 1975, 83, 1, 180-181
- 67 - DE PRIJCKER J., DE BRUYNE C.
Effect of added nucleophiles and pH on alpha-D-mannosidase catalyzed reactions
Carbohydr. Res., 1975, 43, 1, 173-182

- 68 - DESNICK R.J.
Enzyme replacement trial in GM2 gangliosidosis type II (Sandhoff's disease)
in Enzyme therapy in lysosomal storage diseases
Tager J.M., Hooghwinkel G.J.M., Daems W. Th. Ed., 1974, 282-287
North Holland Publishing Company
- 69 - DESNICK R.J.
Allotransplantation in genetic diseases
in Enzyme Therapy in Lysosomal storage Diseases
Tager J.M., Hooghwinkel G.T.M., Daems W. Th. Ed., 1974, 292-297
North Holland Publishing Company
- 70 - DESNICK R.J., KRIVIT W., FIDDLER M.B.
Enzyme therapy in genetic diseases : progress, principles and prospects
in the Prevention of genetic disease and mental retardation
Milunsky A. Ed., 1975, 317-342
W.B. Saunders Company
- 71 - DESNICK R., SHARP H., GRABOWISKI G., BRUNNING R., QUIE P., SUNG J.,
GORLIN R., IKONNE J.
Mannosidosis clinical, morphological immunologic and biochemical studies.
Pediat. Res., 1976, 10, 12, 985-996
- 72 - DEWALD B., TOUSTER O.
A new alpha-D-mannosidase occuring in Golgi membranes
J. Biol. Chem., 1973, 248, 20, 7223-7233
- 73 - DHONDT J.L., FARRIAUX J.P.
Essai de traitement de la mannosidose
dans les Oligosaccharidoses
Farriaux J.P., 1977, 161-163
Cronan et Roques Ed. Lille
- 74 - DIFERRANTE N., NICHOLS B.L., DONNELLY P.V., NERI G., HRGOVCIC R., BERGLUND R.K.
Induced degradation of glycosaminoglycans in Hurler's and Hunter's
syndrome by plasma infusion
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)., 1971, 68, 303-311

- 75 - DIFERRANTE N., NICHOLS B.L., KNUDSON A.G., Mc CREDIE K.B., SINGH J.,
DONNELLY P.V.
Mucopolysaccharide storage diseases : corrective activity of normal
human serum and lymphocytes extracts.
in Birth Defects Original Article Series
Bergsma D. Ed., 1973, 9, 2, 31-40
The Williams and Wilkins Company, Baltimore Publisher
- 76 - DI MATTEO G., ORFEO M.A., ROMEO G.
Human alpha L fucosidase. Purification and properties.
Biochim. Biophys. Acta., 1976, 429, 527-537
- 77 - DILLARD C.J., TAPPEL A.L.
Beta acetyl hexosaminidases and other acid hydrolases of Diploid WI 38
fibroblasts.
Biochemical Medecine, 1974, 11, 275-289
- 73 - DISCHE Z.
Glycoproteins of the lens.
Invest. Ophtalmol., 1965, 4, 592-601
- 79 - DREYFUS J., POENARU L.
Le diagnostic enzymatique dans les maladies lysosomiales et plus particu-
lièrement dans les sphingolipidoses.
Arch. Franç. Ped., 1975, 32, 503-514.
- 80 - DREYFUS J.C., POENARU L., SKALA H.
Lens glycosidases in human and bovine species.
I. Quantitative studies.
Exp. Eye Res., 1977, 25, 47-51
- 31 - DURAND P., BORRONE C.
Fucosidosis and Mannosidosis, glycoprotein and glycosylceramide storage
diseases.
Helv. Paediatr. Acta, 1971, 26, 1, 19-27
- 32 - EAGLE H.
The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells.
J. Cell. Physiol., 1973, 82, 1-8

- 83 - EIJSVOOGEL V.P.
Immunological aspects of replacement therapy in lysosomal storage diseases
in enzyme therapy in lysosomal storage diseases.
Tager J.M., Hooghwinkel G.J.M., Daems W.Th. Ed., 1974, 125-130
North Holland Publishing Company
- 84 - ERIKSSON O., GINSBURG G.E., HULTBERG B., OCKERMAN P.A.
Influence of age and sex on plasma acid hydrolases.
Clin. Chim. Acta, 1972, 40, 1, 181-185
- 85 - FARRIAUX J.P., LEGOUIS I., HUMBEL R., DHONDT J.L., RICHARD P., STRECKER G.,
FOURMAINTRAUX A., RINGEL J., FONTAINE G.
Mannosidose - A propos de 5 cas.
Nouv. Presse Med., 1975, 4, 25, 1867-1870
- 36 - FARRIAUX J.P., FONTAINE G.
La mannosidose : un diagnostic simple
Arch. Fr. Pediat., 1976, 33, 1, 11-22
- 37 - FARRIAUX J.P.
La mannosidose dans les oligosaccharidoses.
Farriaux J.P. Ed., 1977, 89-98
Crouan et Roques Edition Lille.
- 38 - FARRIAUX J.P., DHONDT J.L., STRECKER G.
La mannosidose (à propos de 5 observations)
Lille Médical, 1977, 22, 1, 46-55
- 39 - GALJAARD H., REUSER A.J.J., HEUKELS DULLY M.J., HOOGEVEEN A., KEIJZER D.,
DE WIT VERBEEK H.D. and NIERMEIJER M.F.
Genetic heterogeneity and variation of lysosomal enzyme activities in
cultured human cells.
in Enzyme therapy in lysosomal storage diseases
Tager J.M., Hooghwinkel G.J.M., Daems W. Th. Ed. 1974, 25-37
North Holland Publishing Company



- 90 - GEHLER J., CANTZ M., O'BRIEN J.F., TOLKSDORF M., SPRANGER J.
Communication à la "Birth Defect conference Newport-Beach California
June 1974".
et mannosidosis : clinical and biochemical findings
in Connective tissue diseases, Birth Defects : original article series
Bergsma D. Ed., 1975, 11, 269
- 91 GEHLER J., CANTZ M., SPRANGER J.
The clinical features of mannosidosis
Human Heredity, 1977, 27, 3, 176
- 92 - GOLDSTONE A. et KOENIG H.
Lysosomal enzymes as glycoproteins
Life Sci., 1970, 9, 1341.
- 93 - GOLDSTONE A., KOENIG H., NAYYAR R., HUGHES C., LU C.Y.
Isolation and characterization of a rough microsomal fraction from rat
kidney that is enriched in lysosomal enzymes.
Biochem J., 1973, 132, 259-266
- 94 - GOLDSTONE A. KOENIG H.
Physicochemical modifications of lysosomal hydrolases during intracellular
transport
Biochem. J., 1973, 132, 267-282
- 95 - GORDON A.H.
The role of lysosomes in protein catabolism
in Lysosomes in Biology and Pathology
Dingle J.T. Ed, 1973, 3, 89-137
- 96 - GOTTSCHALK A.
Definition of glycoproteins and their delineation from other carbohydrate
protein complexes.
in Glycoproteins
Gottschalk Ed., 1972, 24-30
Elsevier Publishing company



- 97 - GOTTSCALK A., BUDDECKE E.
Occurence and distribution of glycoproteins
in glycoproteins
Gottschalk Ed., 1972, 529-532
Elsevier Publishing Company
- 98 - GREENE H.L., HUG G., SCHUBERT W.K.
Metachromatic leukodystrophy. Treatment with arylsulfatase A
Arch. Neurol., 1969, 20, 147-153
- 99 - GREGORIADIS G.
Structural requirment for the specific uptake of macromolecules and liposomes
by target tissus.
in Enzyme therapy in lysosomal storage diseases.
Tager J.M., Hooghwinkel G.J.M., Daems W.Th Ed., 1974, 131-162
North Holland Publishing Company
- 100 - GREGORIADIS G.
Catabolism of glycoproteins
in Lysosomes in Biology and Pathology,
Dingle J., Dean R.T. Ed., 1975, 4, 265-294
- 101 - GREVE L.C., ORDIN L.
Isolation and Purification of an alpha mannosidase from coleoptiles of
Avena Sativa
Plant. Physiol., 1977, 60, 478-481
- 102 - HAMERS M.N., WESTERVELD A., KHAN M., TAGER J.M.
Characterization of alpha galactosidase isoenzymes in normal and Fabry
human chinese hamster somatic cell hybrids.
Hum. Genet., 1977, 36, 289-297
- 103 - HARRIS D.J., JOHNSON D.
Mannosidosis in a girl with minor phenotypic changes.
Excerpta Medica International Cong. Series., 1976, 397, 35

- 104 - HARZER K., STENGEL RUTKOWSKI S., GLEY E.D., ALBERT A., MURKEN J.D.,
ZAHN V., HENKEZ K.P.
Pränatale Diagnose der GM2 Gangliosidose Typ 2
Dtsch. Med. Wschr., 1975, 100, 106-108
- 105 - HEMMING F.W.
Biochemical reviews. Dolichol phosphate, a coenzyme in the glycosylation
of animal membrane-bound glycoproteins
Biochem. Soc. Trans., 1977, 5, 1223-1231
- 106 - HERS H.G.
The concept of Inborn lysosomal disease
in Lysosomes and storage diseases
Hers H.G. et Van Hoof F. Ed., 1973, 5, 147-171
Academic Press (New York, London)
- 107 - HEUKELS DULLY M.J., NIERMEIJER M.F.
Variations in lysosomal enzyme activity during growth in culture of
human fibroblasts and amniotic fluid cells.
Exptl. cell Res., 1976, 97, 304-312
- 108 - HEYDEMAN R., MONBAL I.U., BAWENS D., VERCAUTEREN R.
Hydrolytic enzymes in neutrophil and eosinophil leukocytes.
Comp. Biochem. Physiol., 1975, 50, 3, 463-469
- 109 - HICKMAN S., NEUFELD E.F.
A hypothesis for I. Cell disease. Defective hydrolases that do not enter
lysosomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 49, 992-999
- 110 - HICKMAN S., SHAPIRO C.J., NEUFELD E.F.
A recognition marker required for uptake of lysosomal enzyme by cultured
fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. , 1974, 57, 55-62

- 111 - HIEBER V., DISTLER J., MYEROWITZ R., SCHMICKEL R.D., JOURDIAN C.W.
The role of glycosidally bound mannose in the assimilation of Beta galactosidase by generalized gangliosidosis fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 73, 3, 710-717
- 112 - HIRANI S., WINCHESTER B.G., PATRICK A.D.
Measurement of the alpha mannosidase activities in human plasma by a differential assay.
Clin. Chim. acta, 1977, 81, 135-144
- 113 - HOCKING J.D., JOLLY R.D., BATT R.D.
Deficiency of alpha mannosidase in Angus cattle. An inherited lysosomal storage disease.
Biochem. J., 1972, 128, 1, 69-78
- 114 - HOFFSTEIN S., ZURIER R.D., WEISSMANN G.
Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leucocytes.
Quantitative morphologic evidence for an effect of cyclic nucleotides and colchicine on degranulation.
Clinical Immunology and Immunopathology, 1974, 3, 201-217
- 115 - HORS CAYLA M.C., MAROTEAUX P., DE GROUCHY J.
Fibroblastes en culture au cours de mucopolysaccharidoses : influence du sérum sur la metachromasie.
Ann. Genet., 1968, 11, 265-269
- 116 - HUGHES R.C.
Intracellular lysosome membrane glycoproteins. p. 94-100
et Biosynthesis of membrane glycoproteins. p. 182-240
in : membrane glycoproteins. A review of structure and function
Hughes R.C., 1976
Butterworths London Boston.
- 117 - HULTBERG B.
Properties of alpha mannosidase in mannosidosis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1970, 26, 2, 155-159

- 118 - HULTBERG B., OCKERMAN P.A.
Artificial substrates in the assay of acid glycosidases.
Clin. Chim. Acta, 1972, 39, 49-58
- 119 - HULTBERG B., SJOBLAD S., OCKERMAN P.A.
Properties of five acid hydrolases in human skin fibroblast cultures;
Acta Paediat. Scand., 1973, 62, 5, 474-480
- 120 - HULTBERG B., AUTIO S., BERG B., OCKERMAN P.A.
White blood cell acid hydrolases in leukaemias, mucopolysaccharidoses
and mannosidosis.
Scand. J. Haematol., 1973, 10, 4, 265-272
- 121 - HULTBERG B., OCKERMAN P.A., NORDEN N.E.
Isoenzymes of four acid hydrolases in human kidney and urine
Clin. Chim. Acta, 1974, 52, 2, 239-243
- 122 - HULTBERG B., SJOBLAD S., GUSTAVII B.
Acid hydrolases in amniotic fluid and chorionic villi at various stages of
pregnancy
Clin. Chim. Acta, 1974, 53, 221-227
- 123 - HULTBERG B., LUNDBLAD A., MASSON P., OCKERMAN P.A.
Specificity studies on alpha mannosidases using oligosaccharides from
mannosidosis urine as substrates.
Biochim. Biophys. Acta, 1975, 410, 1, 156-162
- 124 - HULTBERG B., MASSON P.
Activation of residual acidic alpha mannosidase activity in mannosidosis
tissues by metal ions.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 67, 4, 1473-1480
- 125 - HULTBERG B., MASSON P., SJOBLAD S.
Neutral alpha mannosidase activity in human serum.
Biochim. Biophys. acta, 1976, 445, 2, 398-405

- 126 - HULTBERG B., LINDSTEN J., SJOBLAD S.
Molecular forms and activities of glycosidases in cultures of amniotic fluid.
Biochem. J., 1976, 155, 599-605
- 127 - HULTBERG B., SJOBLAD S.
Lysosomal enzymes in medium from cultured skin fibroblastes from normal individuals and patients with lysosomal diseases.
Clin. Chim. Acta, 1977, 80, 79-86
- 128 - HULTBERG B., MASSON P.K.
Normal extracellular excretion of acidic alpha mannosidase activity by mannosidosis fibroblast cultures.
Biochim. Biophys. acta., 1977, 481, 573-577
- 129 - HUMBEL R.,
Biochemical screening for mucopolysaccharidosis, mucolipidosis and oligosaccharidosis.
Helv. Paediatr. Acta, 1975, 30, 2, 191-200
- 130 - HUMBEL R., COLLART M.
Oligosaccharides in urine of patients with glycoprotein storage diseases I. Rapid detection by thin layer chromatography.
Clin. Chim. Acta, 1975, 60, 143-146
- 131 - IKONNE J.U., DESNICK R.J.
Mannosidosis : characterization of the alpha D mannosidase isozymes
Am. J. Hum. Genet., 1975, 27, 48 A
- 132 - INAMINE E., DEMAINE A.L.
Location and action of streptomyces griseus alpha-D-mannosidase, an antibiotic transforming enzyme.
Biotechnol. Bioeng., 1970, 12, 2, 159-166
- 133 - INAMINE E., DEMAINE A.L.
Mannosidostreptomycin hydrolase
Methods enzymol., 1975, 43, 637-640

- 134 - INGRAM P.H., BRUNS G.A.P., REGINA V.M., EISENMAN R.E., GERALD P.S.,
Expression of alpha D mannosidase in man-hamster somatic cell hybrids
Biochem. Genet., 1977, 15, 5/6, 455-476
- 135 - JACQUES P.J.,
endocytosis
in Lysosomes in Biology and Pathology.
Dingle J.T., Fell H.B. Ed., 1969, 395-420
Amsterdam : North Holland Publishing Company
- 136 - JOLLY R.D.,
The pathology of the central nervous system in pseudolipidosis of Angus calves
J. Pathol., 1971, 103, 113-121.
- 137 - JOLLY R.D., TSE C.A., GREENWAY R.M.
Plasma mannosidase activity as a mean of detecting mannosidosis heterozygotes
NZ.VET. J. , 1973, 21, 4, 64-69
- 138 - JOLLY R.D.
Animal Model of human disease. mannosidosis of Angus cattle
Am. J. Pathol., 1974, 74, 1, 211-214
- 139 - JOLLY R.D., THOMPSON K.G., TSE C.A., MUNFORD R.E., MERRALL M.
Identification of mannosidosis heterozygotes. factors affecting normal
plasma alpha-mannosidase levels.
NZ. VET. J., 1974, 22, 9, 155-162.
- 140 - JOLLY R.D., THOMPSON K.G., TSE C.A.
Evaluation of a screening programme for identification of mannosidosis
heterozygotes in Angus cattle.
NZ. VET. J., 1974, 22, 10, 185-190
- 141 - JOLLY R., THOMPSON K., MURPHY R., MANKTELOW B., BRUERE A., WINCHESTER B.
Enzyme replacement therapy experiment of nature in a chimeric mannosidosis
calf.
Pediat. Res., 1976, 10, 4, 219-231.

- 142 - JOLLY R.D., JANMAAT A., VAN DE WATER N.S.,
Heterozygote detection : a comparative study using neutrophils, lymphocytes
and two reference parameters in the bovine mannosidosis model.
Biochem. Med., 1977, 18, 402-409
- 143 - JOLLY R.D., THOMPSON K.G.,
Mannosidosis. pathogenesis of lesions in exocrine cells.
J. Pathol., 1977, 121, 1, 59-62.
- 144 - JONES C.H., BALLOU C.E.
Studies on the structure of yeast mannan I. Purification and some properties of
of an alpha-mannosidase from an arthrobacter species.
J.Biol. Chem., 1969, 244, 3, 1043-1051.
- 145 - JONES G.H., BALLOU C.E.
Studies on the structure of yeast mannan. II Mode of action of the
arthrobacter alpha mannosidase on yeast mannan.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 3, 1052-1059
- 146 KABACK M.M.
Thermal fractionation of serum hexosaminidases : applications to heterozygotes
detection and diagnosis of Tay-Sachs' Disease.
in methods in Enzymology, 1972, 28, 862-867
Academic Press.
- 147 - KAPLAN A., ACHORD D.T., SLY W.S.
Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis
receptors on human fibroblasts.
Proc. Natl. Sci. USA, 1977, 74, 5, 2026-2030
- 148 - KAPLAN A., FISCHER D., ACHORD D., SLY W.S.
Phosphohexosyl recognition is a general characteristic of Pinocytosis of
lysosomal glycosidases by human fibroblasts.
J. Clin. Invest., 1977, 60, 1088-1093.

- 149 - KAPLAN A., FISCHER D., SLY W.S.
Correlation of structural features of phosphomannans with their ability to inhibit Pinocytosis of human Beta glucuronidase by human fibroblasts. J. Biol. Chem., 1978, 253, 3, 647-650
- 150 - KATHODA S., SAWAYA Y., ASATSUMA K., SUZUKI F., HAYASHIBE M.
Purification and some properties of alpha mannosidase. Agric. Biol. Chem., 1977, 41, 331-337
- 151 - KAUFMAN H., KOZLOWSKI K., MAROTEAUX P., SIVERMAN F., SPRANGER J.
Nomenclature internationale des maladies osseuses constitutionnelles Ann. Radiol., 1970, 13, 455-464
- 152 - KAYA T., SHIBANO M., KUTSUMI T.
Isolation and characterization of alpha-D-mannosidase from baker's yeast. J. Biochem. (Tokyo), 1973, 73, 1, 181-182.
- 153 - KAYA T., AIKAWA M., MATSUMOTO T.,
Purification and Properties of alpha mannosidase Baker's yeast. J. Biochem., 1977, 82, 1443-1449
- 154 - KELLY T.E., GRAETZ G.
Isolated acid neuraminidase deficiency : a distinct lysosomal storage disease Am. J. Med. Genet., 1977, 1, 31-46
- 155 - KILPATRICK D.G.
Metal ion dependance of alpha mannosidosis from dictyostelium discoideum Biochem. Soc. Trans., 1976, 4, 1083-1085.
- KINT J.A., CARTON D., HUYS A., HOOFT C.,
156 Multiple forms of acid hydrolases .Physico-chemical studies. in Enzyme therapy in lysosomal storage diseases Tager J.M., Hooghwinkel C.J.M., Daems W.Th., Eds., 1974, 227-237 North Holland Publishing Company

- 157 - KISTLER J.P., LOTT I.T., KOLODNY E.H., FRIEDMAN R.B., NERSASIAN R.,
SCHNUR J., MIHM M.C., DVORAK A.M., DICKERSIN R.
Mannosidosis.
Arch. Neurol., 1977, 34, 44-51
- 158 - KJELLMAN B., GAMSTORP I., BRUN A. OCKERMAN P.A., PALMGREN B.
Mannosidosis : clinical and histo-pathologic study
J. Pediatr., 1969, 75, 3, 366-373
- 159 - KNUDSON A.G., DI FERRANTE N., CURTIS J.E.
Effect of leukocyte transfusion in a child with type II mucopolysaccharidosis
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash), 1971, 68, 1738-1742
- 160 - KORNFELD R., KORNFELD S.
Comparative aspects of glycoprotein structure
Ann. Rev. Biochem., 1976, 45, 217-237
- 161 - KURTZ D.J., KANFER J.N.
Cerebral acid hydrolases activities : comparaison in "quaking" and
normal mice.
Science, 1970, 168, 259-260
- 162 - LANGLEY T.J., JEVONS F.R.
Characterization of beef liver glycosidases possibly involved in
glycoprotein degradation.
Arch. Biochem. Biophys., 1968, 128, 2, 312-318
- 163 - LEMAITRE L.
aspects radiologiques de la mucopolysaccharidose de type II et de la mannosidose
dans les oligosaccharidoses
Farriaux J.P., 1977, 107-109
Crouan et Roques Ed.
- 164 - LENNARZ W.J.
Lipid linked sugars in glycoprotein synthesis.
Science, 1975, 188, 986-991

- 165 - LETSON R., DESNICK R.
Puctate lenticular opacities in type II mannosidosis.
Amer. J. Ophtalmol., 1978, 85, 2, 218-225
- 166 - LI Y.T.
Presence of alpha mannosidasic linkage in glycoproteins
J. Biol. Chem., 1966, 241, 1010-1012
- 167 - LI Y.T., LEE Y.C.
Pineapple alpha and Beta-b-mannopyranosidases and their action on core
glycopeptides.
J. Biol. Chem., 1972, 247, 11, 3677-3683
- 168 - LI S.C., LI Y.
An activator stimulating the enzymic hydrolysis of sphingoglycolipids .
J. Biol. Chem., 1976, 251, 4, 1159-1163
- 169 - LIBERT J.
Etude ultrastructurales de la biopsie conjonctivale dans la mannosidose
et la fucosidose.
2eme symposium européen sur les mucopolysaccharidoses - Gand 25-26 avril 1975
- 170 - LIBERT J., TONDEUR M.
La mannosidose. Aspects anatomo-pathologiques en microscopie électronique.
dans les "Oligosaccharidoses"
Farriaux J.P., 1977, 99-103
Crouan et Roques Ed. Lille
- 171 - LLOYD J.B.
Cellular transport of lysosomal enzymes. An alternative hypothesis.
Biochem. J., 1977, 164, 281-282
- 172 - LOEB H., TONDEUR M., TOPPET M., CREMER N.
Clinical, biochemical and ultrastructural studies of an atypical form of
mucopolysaccharidosis.
Acta Paediatr. Scand., 1969, 58, 220-228

- 173 - LOTT I.T., KOLODNY E.H., DICKERSIN R.
Mannosidosis (Letters to Editor Reply)
Arch. Neurol., 1977, 34
- 174 - LOUCHEUX LEFEBVRE M.H., AUBERT J.P.
Hypothèses concernant l'organisation spatiale des glycoprotéines
C.R. Acad. Sci. Paris, 1976, 282, 585-587
- 175 - LOUISOT P.
Mucopolysaccharides et glycoprotéines du tissu conjonctif.
Lyon Pharmaceutique, 1972, 23, 2, 156-162
- 176 - LOUISOT P.
Les glycoprotéines
dans : Biochimie structurale - Glucides.
Louisot P., 1976, 11, 123-138
Simep Editions
- 177 - LOWRY O.H. ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275
- 178 - LUNDBLAD A., MASSON P., NORDEN N., SVENSSON S., OCKERMAN P.,
Determination of a mannose containing trisaccharide in the urine of patients
and heterozygotes of mannosidosis.
Biomed. Mass. Spectrom., 1975, 2, 6, 285-287
- 179 - LUNDBLAD A., NILSSON B., NORDEN N., SVENSSON S., OCKERMAN P., JOLLY R.
A urinary pentasaccharide in bovine mannosidosis.
Eur. J. Biochem., 1975, 59, 2, 601-605
- 180 - LUNNEY J., ASHWELL G.
A hepatic receptor of avian origin capable of binding specifically modified
glycoproteins
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1976, 73, 2, 341-343

- 181 - MAIRE I., HERMIER M., ZABOT M.T., MATHIEU M. COTTE J.
A propos d'une étude familiale de mannosidose. Intérêt de l'étude pour le diagnostic prénatal.
Dans "Les colloques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale"
Boue A. Ed., 1976, 61, 197-212
- 182 - MAIRE I., HERMIER M., ZABOT M.T., MATHIEU M., COTTE J.
A propos d'une étude familiale de mannosidose. Intérêt de l'étude pour Le diagnostic prénatal.
dans "les Oligosaccharides"
Farriaux J.P., 1977, 149-158
Crouan et Roques, Lille .
- 183 - MALI J.W.H., BERGERS A.M.G., VAN DEN HURK J.J.M.A., MIER P.D.
VAN DE STAAK W.J.B.M.
A lysosomal storage disorder of the epidermis characterized by a deficiency of alpha mannosidase and an accumulation of mannose rich materials.
British J. Dermatol., 1976, 95, 627-631
- 184 - MAPES C.A., ANDERSON R.C., SWEeley C.C., DESNICK R.J., KRIVIT W.
Enzyme replacement in Fabry's disease and inborn error of metabolism
Science, 1970, 169, 987-992
- 185 - MARINKOVIC D., MARINKOVIC J.
Isolation and properties of alpha D mannosidase from human kidney
Biochem. J., 1976, 155, 2, 217-223
- 186 - MARINKOVIC D.V., PETROVIC S.L., MARINKOVIC J.V., MARINKOVIC J.N.
Uptake of iodinated human kidney alpha D mannosidase by rat liver
Biochem. J., 1976, 159, 729-736
- 187 - MAROTEAUX P.
Mannosidose
dans les maladies osseuses de l'enfant.
Maroteaux P., 1974, 265-266
Flammarion

- 188 - MAROTEAUX P., HUMBEL R.
Les oligosaccharidoses
Arch. Franç. Ped., 1976, 33, 641-643
- 189 - MARSH C.A., GOURLAY G.C.
Evidence for a non lysosomal alpha mannosidase in rat liver homogenates
J. Mol. Biol., 1971, 57, 3, 142-148
- 190 - MARSHALL R.D.
Glycoproteines
Ann. Rev. Biochem., 1972, 41, 673-695
- 191 - MASSON P.K., LUNDBLAD A.
Mannosidosis : detection of the disease and of heterozygotes using serum and leucocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974, 56, 2, 296-303
- 192 - MATSUDA I., ARASHIMA S., ANAKURA M., OKA Y.
Alpha L fucosidase and alpha D mannosidase activity in the white blood cells in the disease and carrier state of fucosidosis
Clin. Chim. Acta, 1973, 48, 1, 9-13
- 193 - MATSUDA I., YAMAMOTO J., NAGATA N., NINOMIYA N., AKABOSHI I., OKTSUBA H., KATSUKI T.
Lysosomal enzyme activities in cultured lymphoid cell lines
Clin. Chim. Acta., 1977, 80, 483-486
- 194 - MATTA K.L., BAHL O.P.
Glycosidases of aspergillus niger .IV - Purification and characterization of alpha mannosidase.
J. Biol. Chem., 1972, 247, 6, 1780-1787
- 195 - MELLORS A., HARWALKAR V.R.
Glycosidases in bovine milk : alpha mannosidase and its inhibition by zwitterions.
Can. J. Biochem., 1968, 46, 11, 1351-1356

- 196 - MAZIERE J.C., MAZIERE C., POLONOVSKI J.
Activités des glycosidases lysosomiales des fibroblastes de hamsters normaux et transformés par le SV 40 en fonction des différentes phases de la culture. Effet du cycloheximide.
Biol. Cell., 1977, 30, 1-4
- 197 - MERSMANN G., VON FIGURA K., BUDDECKE E.
Mannosidosis.
Storage of mannose containing material in cultured human mannosidosis cells and metabolic correction by Pig kidney alpha mannosidase.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, 357, 641-648
- 198 - MERSMANN G., BUDDECKE E.
Evidence for material from mannosidosis fibroblasts cross reacting with anti-acidic alpha mannosidase antibodies.
Febs Letters, 1977, 73, 1, 123-126
- 199 - MERSMANN G., BUDDECKE E.
Immunological cross reactivity between alpha mannosidases from different sources.
Int. J. Biochem., 1977, 8, 11, 763-768
- 200 - MERSMANN G., WILDE F.J., BUDDECKE E.
Differences in intracellular corrective activity in cultured mannosidosis cells of acidic alpha mannosidases from various sources.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, 359, 421-425
- 201 - MERSMANN G., BECKER R., BUDDECKE E.
Amount and properties of uptake form in preparations of alpha mannosidase from pig kidney
Biochim. Biophys. Acta., 1978, 525, 124-161
- 202 - MERTENS STRIJTHAGEN J., DE SCHRIJVER C., WATTIAUX DE CONINCK S., WATTIAUX R.
Rat liver lysosomes at different ages
Biochem. Soc. Trans., 1977, 5, 1170-1171

- 203 - MILLA P.J., BLACK I.E., PATRICK A.D., HUGH-JONES K., OBERHOLZER V.
Mannosidosis
Clinical and biochemical study
Arch. Dis. Child., 1977, 52, 937-942
- 204 - MONTREUIL J.
Recent Data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins.
Metabolic and biological implications
Pure and Applied Chemistry , 1975, 42, 431-477
- 205 - MONTREUIL J.
Discussion n° 2
dans "les Oligosaccharidoses"
Farriaux J.P., 1977, 164
Crouan et Roques
- 206 - MORELL A.G., GREGORIADIS G., SCHEINBERG I.H., HICKMANN J., ASHWELL G.
The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in
the circulation.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 5, 1461-1467
- 207 - MRAZ W., FISHER G., JATZKEWITZ H.
Low molecular weight proteins in secondary lysosomes as activators of
different sphingolipid hydrolases.
FEBS Letters, 1976, 67, 1, 104-108
- 208 - MURAMATSU T., EGAM F.
Alpha mannosidase and Beta mannosidase from the liver of Turbo cornutus
Purification, properties and application in carbohydrate research.
J. Biochem., 1962, 62, 700-707
- 209 - MURAMATSU T., KOIDE N., CECCARINI C., ATKINSON P.
Characterization of mannose labeled glycopeptides from human diploid cells
and their growth dependent alterations.
J. Biol. Chem., 1976, 251, 15, 4673-4679

- 210 - MURPHREE A.L., BEAUDET A.L., PALMER E.A., NICHOLS B.G.,
Cataract in mannosidosis
in the Eye and the inborn errors of metabolism
Birth Defect Original article series, 1976, 12, 319
- 211 - NACCACHE P.H., SHOWEL H.J., BECKER E.L., SHA'AFI R.A.
Changes in ionic movements accross rabbit polymorphonuclear leukocytes
membranes during lysosomal enzyme release.
Possible ionic basis for lysosomal Enzyme Release.
J. Cell. Biol., 1977, 75, 635-649
- 212 - NADLER H.L.
Treatment of acid phosphatase deficiency disorders.
in Birth defects : original article series
Bergsma D., 1973, 9, 2, 195-197
The Williams and Wilkins Company.
- 213 - NEUFELD E.F., CANTZ M.J.
Corrective factors from inborn errors of mucopolysaccharide metabolism
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1971, 179, 580-591
- 214 - NEUFELD E., LIM T.W., SHAPIRO L.J.
Inherited disorders of lysosomal metabolism
Ann. Rev. Biochem., 1975, 367-376
- 215 - NEUFELD E.F., SANDO G.N., GARVIN J., ROME L.H.
The transport of lysosomal enzymes
Journal of Supramolecular structure, 1977, 6, 95-101
- 216 - NICOL D.M., LAGUNOFF D., PRITZ P.R.
Differential uptake of Beta glucuronidase isoenzymes from spleen by
deficient fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 59, 3, 941-946
- 217 - NORDEN N.E., OCKERMAN P.A., SZABO L.
Urinary mannose in mannosidosis
J. Pediatr., 1973, 82, 4, 686-688

- 218 - NORDEN N.E., LUNDBLAD A., SVENSSON S., OCKERMAN P.A., AUTIO S.
A mannose containing trisaccharide isolated from urines of three patients with mannosidosis.
J. Biol. Chem., 1973, 248, 17, 6210-6215
- 219 - NORDEN N.E., LUNDBLAD A., OCKERMAN P.A., JOLLY R.D.
Mannosidosis in Angus Cattle : partial characterization of two mannose containing oligosaccharides.
FEBS Letters, 1973, 35, 2, 209-212
- 220 - NORDEN N.E., LUNDBLAD A., SVENSSON S., AUTIO S.
Characterization of two mannose containing oligosaccharides isolated from the urine of patients with mannosidosis
Biochemistry, 1974, 13, 5, 871-874
- 221 - NOVIKOFF A.B., ESSNER E., QUINTANA N.
Golgi apparatus and lysosomes.
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 1964, 23, 1010-1021
- 222 - NOVIKOFF A.B.
Lysosomes : a personal account
in "Lysosomes and storage diseases".
Hers H.G., VAN Hoof F., 1973, 2-37
New York Academic Press
- 223 - OCKERMAN P.A.
A generalised storage disorder resembling Hurler's syndrome
Lancet, 1967, 2, 239
- 224 - OCKERMAN P.A.
Beta galactosidase and alpha mannosidase deficiency. Primary enzyme defects in gargoylism and a new storage disease ?
Acta Paediatr. Scand., 1967, suppl. 177, 35-36
- 225 - OCKERMAN P.A.
Diseases of glycoprotein storage
Lancet, 1969, 1, 597, 734-735

- 226 - OCKERMAN P.A.
Fluorimetric estimation of 4-methylumbelliferyl alpha mannosidase activity
in blood plasma
Clin. Chim. Acta, 1969, 23, 3, 479-482
- 227 - OCKERMAN P.A.
Mannosidosis : isolation of oligosaccharide storage material from brain
J. Pediatr., 1969, 75, 3, 360-365
- 228 - OCKERMAN P.A.
Letters to the Editor
J. Pediatr., 1970, 77, 168-169
- 229 - OCKERMAN P.A., NORDEN N.E., SZABO L.,
Problems in the clinical diagnosis of glycoprotein storage diseases
Adv. Exp; Med. Biol., 1972, 25, 281
- 230 - OCKERMAN P.A., AUTIO S., NORDEN N.E.,
Diagnosis of mannosidosis
Lancet, 1973, 1, 796, 207-208
- 231 - OCKERMAN P.A.
Mannosidosis
in lysosomes and storage diseases
Hers H.G., Van Hoof F., 1973, 291-305
Academic Press
- 232 - OKUMURA T., YAMASHINA I.
Purification of alpha mannosidase from hog kidney and its action on
glycopeptides.
J. Biochem., 1970, 68, 4, 561-571
- 233 - OKUMARA T., YAMASHINA I.
Further purification and characterization of alpha D mannosidase from
hog kidney
J. Biochem., 1973, 73, 1, 131-138
- 234 - OPHEIM D.J., TOUSTER O.
Lysosomal alpha D mannosidase of rat liver.
J. Biol. Chem., 1978, 253, 4, 1017-1023

- 235 - OPHEIM D.J.
Alpha D mannosidase of *saccharomyces cerevisiae*
Characterization and modulation of activity.
Biochim., Biophys. Acta, 1978, 524, 121-130
- 236 - ORMOS J., MONUS Z., SZABO L., CSAPO Z.
Die bedeutung der elektronenmikroskopischen untersuchung der leberbiopsie bei
der beurteilung der verschiedenen mucopolysaccharidosen
Verh. Dtsch. Ges. Pathol., 1971, 55, 399-405
- 237 - PATEL H., RYMAN B.
alpha mannosidase in zinc deficient rats : possibility of liposomal
therapeutic in mannosidosis
Biochem. Soc. Trans., 1974, 2, 5, 1014-1017
- 238 - PAUS E., CHRISTENSEN T.B.
Alpha mannosidase from *phaseolus vulgaris*. Purification and characterization
Eur. J. Biochem., 1972, 25, 2, 308-314
- 239 - PAUS E.,
Immunoabsorbent affinity purification of the two enzyme forms of alpha
mannosidase from *phaseolus vulgaris*.
FEBS Letters, 1976, 72, 1, 39-42
- 240 - PERCY A.K., BRADY R.O.
Metachromatic leukodystrophy : diagnosis with samples of venous blood
Science, 1968, 161, 594-595
- 241 - PERELMAN R., NATHANSON M., LEPASTIER G., LESAVRE Ph., PLAINFOSSE B.,
CHIRAZI S., SERINGE Ph.
Mannosidose associée à l'absence d'alpha 1 antitrypsine
Ann. Pediatr., 1975, 22, 385-396
- 242 - PHILLIPS N.C., ROBINSON D., WINCHESTER B.G., JOLLY R.D.
Mannosidosis in Angus Cattle . The enzymic defect.
Biochem. J., 1974, 137, 2, 363-371

- 243 - PHILLIPS N.C., ROBINSON D., WINCHESTER B.G.,
Human liver alpha D mannosidase activity
Clin. Chim. Acta, 1974, 55, 1, 11-19
- 244 - PHILLIPS N., ROBINSON D., WINCHESTER B.
Immunological characterization of human liver alpha D mannosidase.
Biochem. J., 1975, 151, 3, 469-472
- 245 - PHILLIPS N.C., ROBINSON D., WINCHESTER B.G.
Immunological characterization of human alpha D mannosidase
Biochem. Soc. Trans., 1975, 3, 2, 238-240
- 246 - PHILLIPS N., ROBINSON D., WINCHESTER B.G.
Characterization of human liver alpha D mannosidase purified by affinity
chromatography
Biochem. J., 1976, 153, 3, 579-581
- 247 - PHILLIPS N., WINCHESTER B., JOLLY R.
A serological investigation into the acidic alpha D mannosidase in normal
Angus Cattle and in a calf with mannosidosis.
Biochem. J., 1977, 163, 2, 269- 277
- 248 - PHILLIPS N.C., THORPE R.
Lysosomal glycosidases activities in human hair roots.
Clin. Chim. Acta., 1978, 83, 93-98
- 249 - PODUSLO S.E., TENNEKON G., PRICE D., MILLER K., Mac KHANN G.M.
Fetal metachromatic leukodystrophy : pathology, biochemistry and a study
of in vitro enzyme replacement in CNS tissue
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1976, 35, 6, 622-632
- 250 - POENARU L., DREYFUS J.C.
Electrophoractic heterogeneity of human alpha mannosidase
Biochim. Biophys. acta, 1973, 303, 1, 171-174

- 251 - PREMANAND V.W.
Simple procedure for the isolation of jack bean alpha D mannosidase by
benzidine sepharose chromatography
J. Chromatogr., 1978, 152, 565-568
- 252 - PRESTON J.F., LAPIS E., GANDER J.E.,
The appearance of exo-alpha-mannosidase in cultures of penicillium charlesii
Arch. Mikrobiol., 1973, 88, 1, 71-76
- 253 - PRICER W., ASHWELL G.
Subcellular distribution of a mammalian hepatic binding protein specific
for asialo-glycoproteins
J. Biol. Chem., 1976, 251, 3, 7539-7544
- 254 - RADIN N., ARORA R., ULLMAN M., BRENKERT A., AUSTIN J.
A possible therapeutic approach to Krabbe's globoïd leukodystrophy and the
status of cerebroside synthesis in the disorder.
Res. Commun. Chem. Path. Pharm. 1972, 3, 637-646
- 255 - REUSER A., HALLEY D., DEWIT E., HOOGEVEEN A., VAN DER KAMP M., MULDER M.
GALJAARD H.
Intracellular exchange of lysosomal enzymes : enzyme assays in single human
fibroblasts after cocultivation.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 69, 2, 311-318
- 256 - RIETRA P., VAN DEN BERGH F., TAGER J.
Recent development in enzyme replacement therapy of lysosomal storage disease
in Enzyme therapy in lysosomal storage diseases
Tager J.M., Hooghwinkel G.J.M., Daems W.Th Ed. 1974, 53-79
North Holland Publishing Company
- 257 - ROBINSON D.
Multiple forms of lysosomal enzymes. Statement of the problem.
in Enzyme therapy in Lysosomal Storage Diseases.
Tager J.M., Hooghwinkel G.J.M., Daems W.Th., 1974, 217-226
North Holland Publishing Company

- 258 - ROBINSON D.,
Multiple forms of glycosidases in the normal and pathological states.
Enzyme, 1974, 18, 1/2, 114-118
- 259 - ROBINSON D., PHILLIPS N.C., WINCHESTER B.
Affinity chromatography of human liver alpha D mannosidase.
FEBS Lett., 1975, 53, 1, 110-112
- 260 - ROMANO C., CORDONE C., SIETTI C.
Mannosidosis, a new case
Proc. XIII Int. Congr. Pediatr., 1971, 15, 83,
(cit   par Vidgoff 1977)
- 261 - ROSSO G.C., MASUSHIGE S., QUILL H., WOLF G.
Transfer of mannose from mannosyl retinyl phosphate to protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 9, 3762-3766
- 262 - RYAN C.A., LEE S.Y., NADLER H.L.
Effect of culture conditions on enzyme activities in cultivated human
fibroblasts.
Exp. Cell. Res., 1972, 71, 388-392
- 263 - SAITA M., IKENAKA T., MATSUSHIMA Y.
Isolation and characterization of alpha-D-mannosidase from soy bean
J. Biochem., Tokyo, 1971, 70, 5, 827-833
- 264 - SANDO G.N., NEUFELD E.F.
Recognition and receptor mediated uptake of a lysosomal enzyme alpha L
iduronidase, by cultured human fibroblasts.
Cell , 1977, 12, 619-627
- 265 - SCHLESINGER P., RODMAN J.S., FREY M., LANG S., STAHL P.
Clearance of lysosomal hydrolases following intravenous infusion.
The role of liver in the clearance of Beta glucuronidase and N acetyl Beta
D glucosaminidase.
Arch. Biochem. Biophys., 1976, 177, 606-614

- 266 SCHNEIDER E.L., STANBRIDGE E.J., EPSTEIN C.J., GOLBUS M., ABBO HALBASCH G.
RODGERS G.
Mycoplasma contamination of cultured amniotic fluid cells : potential hazard
to prenatal chromosomal diagnosis.
Science, 1974, 184, 477-478
- 267 - SCRIVER C.R.
Enzyme therapy in genetic disease : pox on pax
in Birth Defects. Proceedings of the fourth international conference
Vienna. Austria 2-8 sept. 1973
Motulsky A.G., Lenz W., 1974, 114-126
Excerpta Medica Amsterdam
- 268 - SEGEL I.M.
Enzyme kinetics
A. Wiley - Interscience Publication 1975.
- 269 - SHEPHERD V., MONTGOMERY R.
Alpha D mannosidase preparation and properties of free and insolubilized
enzyme.
Biochim. Biophys. Acta., 1976, 429, 3, 884-894
- 270 - SHOUP V., TOUSTER O.
Purification and characterization of the alpha D mannosidase of rat liver
cytosol.
J. Biol. Chem., 1976, 251, 13, 3845-3852
- 271 - SNAITH S.M., LEVVY G.A.
Purification and properties of alpha D mannosidase from Jack-Bean meal
Biochem. J., 1968, 110, 4, 663-670
- 272 - SNAITH S.M., LEVVY G.A.
Purification and properties of alpha D mannosidase from rat epididymis
Biochem. J., 1969, 114, 1, 25-33
- 273 - SNAITH S.M., LEVVY G.A., HAY A.J.
Purification and properties of alpha D mannosidase from the limpet, patella
vulgata
Biochem. J., 1970, 117, 1, 129-137

- 274 - SNAITH S.M., HAY A.J., LEVY G.A.
The relationship between the mannosidase activity and the zinc content of mammalian sex organs.
J. Endocrinol., 1971, 50, 4, 659-667
- 275 - SNAITH S.M.
Activation by ferrous ions of an alpha mannosidase in rat testis and liver
Biochem. Soc. Trans., 1973, 1, 6, 1266-1267
- 276 - SNAITH S.M.
Characterization of Jack Bean alpha D mannosidase as a zinc metalloenzyme
Biochem. J., 1975, 147, 1, 83-90
- 277 - SNAITH S.M.
Evidence for several alpha mannosidase activities in rat testis.
Biochem. Soc. Trans., 1975, 3, 6, 1030-1031
- 278 - SNAITH S.M.
Multiple alpha mannosidase activities in mammalian tissues as shown by metal ion activation
Biochem. J., 1977, 163, 3, 557-565
- 279 - SPEAKE B.K., WHITE D.A.
The formation of lipid linked sugars as intermediates in glycoprotein synthesis in rabbit mammary gland.
Biochem. J., 1978, 170, 273-283
- 280 - SPIK G.
Etudes des propriétés des glycosidases impliquées dans le catabolisme des glycoprotéines
dans les Oligosaccharidoses.
Farriaux J.P., 1977, 31-41
Crouan et Roques Ed.
- 281 - SPIRO R.G., FUKUSHI S.
The lens capsules. Studies on the carbohydrate units.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 2049-2058

- 282 - SPRANGER J.W., WIEDEMANN H.R.
The genetic microlipidoses. Diagnosis and differential diagnosis.
Human genetk, 1970, 9, 113-139
- 283 - SPRANGER J.W., WIEDEMANN H.R.
The genetic mucolipidoses.
Neuropaediatric , 1970, 2, 1, 3-16
- 284 - SPRANGER J., GEHLER J., CANTZ M.
The radiographic features of mannosidosis
Radiology, 1976, 119, 401-407
- 285 - SPRANGER J., GEHLER J., CANTZ M.
Mucolipidosis I. A sialidosis
Am. J. Med. Genet., 1977, 1, 21-29
- 286 - SRIVASTAVA S.K., AWASTHI Y.C., YOSHIDA A., BEUTLER E.
Studies on human Beta D N acetyl hexosaminidase. I. Purification and properties.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 7, 2043-2048
- 287 - STAHL P., RODMAN J.S., SCHLESINGER P.
Clearance of lysosomal hydrolases following intravenous infusion. Kinetic and competition experiments with Beta glucuronidase and N acetyl Beta D glucosaminidase.
Arch. Biochem. Biophys., 1976, 117, 694-605
- 288 - STANBRIDGE E.J., TISCHFIELD J.A., SCHNEIDER E.L.
Appearance of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase activity as a consequence of mycoplasma contamination.
Nature (London), 1975, 256, 329-330
- 289 - STEGER L.D., DESNICK R.J.
Enzyme therapy VI : comparative in vivo fates and effects on lysosomal integrity of enzyme entrapped in negatively and positively charged liposomes.
Biochim. Biophys. acta, 1977, 464, 530-546
- 290 - STENDAHL O., TAGESSON CHR.
Interaction of liposomes with polymorphonuclear leukocytes.
I. Studies of the mode of interaction
Exp. Cell. Res., 1977, 108, 167-174

- 291 - STOCKERT R.J., MORELL A.G., SCHEINBERG I.H.
The existence of a second route for the transfer of certain glycoproteins from the circulation into the liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 68, 3, 988-993
- 292 - STRAUSS R.S.
Clinical application of genetic engineerings : prospects for the future in Lipid Storage Diseases.
Bernsohn J., Grossman H.J., 1971, 291-312
Academic Press.
- 293 - STRECKER G.
Les glucides de l'urine humaine
Thèse Science, Lille 1970
- 294 - STRECKER G.
Glycoprotéines et glycoprotéinoses
dans les Oligosaccharidoses
Farriaux J.P., 1977, 12-30
Crouan et Roques
- 295 - STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DHONDT J.L., FARRIAUX J.P.
Etude biochimique des mannosides urinaires excrétés au cours de la mannosidose
Biochimie, 1976, 68, 579-586
- 296 - STRECKER G., LEMAIRE POITAU A.
Fractionation and characterization of acidic oligosaccharides and glycopeptides from normal and pathologic urines.
J. Chromatogr. 1977, 143, 553-559.
- 297 - STRUCK D.K., LENNARZ W.J.
Utilisation of exogenous UDP mannose for the synthesis of mannose containing lipids and glycoproteins by oviduct cells.
J. Biol. Chem., 1976, 251, 8, 2511-2519

- 298 - SUKENO T., TARENTINO A.L., PLUMMER T.H., MALEY F.
Purification and properties of alpha-D- and Beta-D-mannosidases
from hen oviduct
Biochemistry., 1972, 11, 8, 1493-1501
- 299 - SUZUKI J., KUSHIDA H.
Studies on mammalian glycosidases. V Effects of metal ions upon acidic
and neutral alpha glucosidases, beta-galactosidases, and alpha amnosidases
in liver extract of rabbit.
J. Biochem., (Tokyo), 1973, 74, 3, 627-629
- 300 - SWALLOW D.M., GARDINER S.E., HARRIS H., ARTHUR E., STEEL C.M., EVANS H.J.
Lysosomal enzyme in human lymphoblastoid lines : unusual characteristics
of RAJI and DAUDI.
Ann. Hum. Genet., 1977, 41, 9-16
- 301 - SWAMINATHAN N., MATTA K.L., DONOSOL A., BAHL O.P.
Glycosidases of Aspergillus Niger-3-purification and characterization of
1-2-alpha mannosidase.
J. Biol. Chem., 1972, 247, 6, 1775-1779
- 302 - TAYLOR H.A., THOMAS G.H., AYLSWORTH A., STEVENSON R.E., REYNOLDS L.W.
Mannosidosis : deficiency of a specific alpha-mannosidase component in
cultured fibroblasts.
Clin. Chim. acta, 1975, 59, 1, 93-99
- 303 - THOMPSON K., LOLLY R., WINCHESTER B.
Mannosidosis. Use of reference enzymes in heterozygotes detection.
Biochem. Med., 1976, 15, 3, 233-237
- 304 - THORPE S.R., FIDDLER M.B., DESNICK R.J.
Enzyme therapy.V : In vivo fate of erythrocyte entrapped Beta glucuronidase
in Beta glucuronidase deficient mice.
Pediatr. Res., 1975, 9, 918-923

- 305 - TSAY G.C., DAWSON G., MATALON R.
Neurovisceral storage disease resulting from alpha mannosidase deficiency
Trans. Am. Soc. Neurochem., 1974, 5, 135-139
- 306 - TSAY G.C., DAWSON G., MATALON R.
Excretion of mannose rich complex carbohydrates by a patient with alpha-mannosidase deficiency (mannosidosis)
J. Pediatr., 1974, 84, 6, 865-868
- 307 - TSAY G.C., DAWSON G.
Glycopeptide storage in fibroblasts from patients with inborn errors of glycoprotein and glycosphingolipid catabolism.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 63, 3, 807-814
- 308 - TSAY G., DAWSON G., MATALON R.
Glycopeptide storage in skin fibroblasts cultured from a patient with alpha-mannosidase deficiency.
J. Clin. Invest., 1975, 56, 3, 711-718
- 309 - TSAY C.C., DAWSON G.
Oligosaccharide storage in brains from patients with fucosidosis, GM1 gangliosidosis and GM2 gangliosidosis (Sandhoff's disease).
J. Neurochem., 1976, 27, 733-740
- 310 - TSUJI H., HATTORI N., YAMAMOTO T., KATO K.
The synthesis of rat liver lysosomes. I comparison of the microsomal, Golgi and lysosomal Beta glucuronidases.
J. Biochem., 1977, 82, 619-636
- 311 - TSUJI H., KATO K.
the synthesis of rat liver lysosomes. II Intracellular transport of Beta glucuronidase.
J. Biochem., 1977, 82, 637-645
- 312 - TULSIANI D., OPHEIM D., TOUSTER O.
Purification and characterization of alpha D mannosidase from rat liver golgi membranes.
J. Biol. Chem., 1977, 252, 10, 3227-3233

- 313 - ULRICH K., MERSMANN G., WEBER E., VON FIGURA K.
Evidence for lysosomal enzyme recognition by human fibroblasts via a phosphorylated carbohydrate moiety
Biochem. J., 1978, 170, 643-650
- 314 - VAES G.
Lysosomes and the cellular physiology of bone resorption
in Lysosomes in Biology and Pathology.
Dingle J.T., Fell J.B., 1969, vol. 1, 217-253
North Holland Publishing Company
- 315 - VAMOS HURWITZ E., TONDEUR M., HUMBEL R., PHILIPPART M., HOSLI P., LOEB H.
Mannosidosis : findings in cultured fibroblasts and urine.
Acta Paediat. Scand., 1975, 64, 6, 865-867
- 316 - VAN HOOF F., HERS H.G.
The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidosis
Europ. J. Biochem., 1968, 7, 34-44
- 317 - VAN HOOF F.
Les mucopolysaccharidoses en tant que thesaurismoses lysosomiales.
thèse Louvain 1972
- 318 - VAN HOOF F., HERS H.G.
FARBER's disease
in Lysosomes and storage diseases.
Hers H.G., Van Hoof F., 1973, 559-563
Academic Press. New York and London
- 319 - VAN HOOF F.
Acid hydrolases in tears
2e symposium européen sur les mucopolysaccharidoses.
Gand, 25-26 avril 1975.
- 320 - VAN HOOF F., LIBERT J., AUBERT-TULKENS G., SERRA M.V.
The assay of lacrymal enzymes and the ultrastructural analysis of conjunctival biopsies : New techniques for the study of inborn lysosomal diseases.
Metabolic. Ophthalmology, 1977, 1, 3/4, 165-172

- 321 - VIALARD J.L., MOTTA C., DASTUGE G.
Detection of human cerebrospinal fluid alpha mannosidase (EC.3.2.1.24)
Spectrofluorimetric assay and correlative study with N acetyl beta glucosaminidase (EC.3.2.1.30)
Pathol. Biol., 1973, 21, 9, 973-980
- 322 - VIDGOFF J., LOVRIEN E.W., BEALS R.K., BUIST N.R.M.
Mannosidosis in three brothers.
A review of the litterature.
Medecine, 1977, 56, 4, 335-348
- 323 - VLADUTIU G.D., RATTAZZI M.C.
Icell disease. Desialylation of Beta hexosaminidase and its effect on uptake by fibroblasts.
Biochim. Biophys. acta, 1978, 539, 31-36
- 324 - VLADUTIU G.D.
I. Cell disease. A hypothesis for the structure of the carbohydrate recognition site on Beta D N acetyl hexosaminidase.
Biochem. J., 1978, 171, 509-512
- 325 - VON FIGURA K., KRESSE H
Inhibition of pinocytosis by cytochalasine B. Decrease in intracellular enzyme activities and increased storage of glycosaminoglycans
Eur. J. Biochem., 1974, 48, 357-363
- 326 - VON FIGURA K.
Acid hydrolases : production, release and uptake by cultured fibroblasts.
in the Cultured cell and inherited metabolic disease,
Harkness R.A., Cockburn F., 1977, 105-119
MTP Press Limited. Lancaster.
- 327 - WAECHTER C.J., LENNARZ W.J.
The role of polyprenol linked sugars in glycoprotein synthesis
Ann. Rev. Biochem., 1976, 95-112

- 328 - WEINSTEIN J.N., BLUMENTHAL R., SHARROW S.O., HENKART P.A.
Antibody mediated targeting of liposomes. Binding to lymphocytes doesn't ensure incorporation of vesicle contents into the cells.
Biochim. Biophys. cta., 1978, 509, 2, 272-281
- 329 - WHITTEM J.H., WALKER D.
Neuropathy and pseudolipidosis in Aberdeen Angus calves.
J. Pathol. Bacteriol., 1957, 74, 281-288
- 330 - WIEDERSCHAIN G.Y., ROSENFELD E.L., BRUSILOWSKY A.I., KOLIBABA L.G.
alpha-L.Fucosidase and other glycosidases in human placenta, foetus, liver and amniotic fluid at various stages of gestation.
Clin. Chim. Acta, 1971, 35, 1, 99-107
- 331 - WIESMANN U.N. DIDONATO S., HERSCHKOWITZ N.H.
Effect of chlorquine on culture fibroblasts. Release of lysosomal hydrolases and inhibition of their uptake.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 66, 4, 1338-1343
- 332 - WIESMANN U.N., MEIER C., SPYCHER M.A., SCHMID W., BISCHOFF A., GAUTIER E., HERSCHKOWITZ N.
Prenatal metachromatic leukodystrophy.
Helv. Paediat. Acta., 1975, 30, 31-42
- 333 - WILSON J.R., WILLIAMS D., SCHACHTER H.
The control of glycoprotein synthesis : N.acetylglucosamine linkage to a mannose residue as a signal for attachment of L.fucose to the asparagine linked N acetyl glucosamine residue of glycopeptide from alpha 1 acid glycoprotein
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 72, 3, 909-916
- 334 - WINCHESTER B., VAN DE WATER N., JOLLY R.
The nature of the residual alpha mannosidase in plasma in bovine mannosidosis
Biochem. J., 1976, 157, 1, 183-186
- 335 - WOLD F.
Chemical modification of enzymes
in Birth Defects : original article series
Bergsma D. , 1973, 9, 2, 46-54
Williams and Wilkins Company

336 - WOOD S.

The effect of environmental pH upon acid hydrolases activities of cultured human diploid fibroblasts.

Exp. cell. Res., 1975, 96, 317-321

337 - WOOD S.

A sensitive fluorimetric assay for alpha L fucosidase

Clin. Chim. Acta, 1975, 58, 251-256

338 - YOUNG E., WILLCOX P., WHITFIELD A.E., PATRICK A.D.

Variability of acid hydrolases activities in cultured skin fibroblasts and amniotic fluid cells.

J. Med. Genet., 1975, 12, 224-228;

339 - YUNIS J., LEWANDOWSKI R., SANFILIPPO S., TSAI M., FONI I., BRUHL H.

Clinical manifestations of mannosidosis . A longitudinal study

Amer. J. Med., 1976, 61, 6, 841-848

	<u>PAGES</u>
<u>TABLEAU 1</u> : Diverses formes de l'alpha D mannosidase D'après l'influence du pH de mesure d'activité	34 - 35
<u>Tableau 2</u> : Formes enzymatiques multiples de l'alpha D mannosidase (tableau emprunté à HULTBERG).....	44
<u>Tableau 3</u> : Revue des cas de la littérature	62 - 63
<u>Tableau 4</u> : Les cas de la littérature - signes cliniques	64
<u>Tableau 5</u> : Les cas de la littérature examens paracliniques	68 - 69
<u>Tableau 6</u> : Les cas de la littérature - Données Biochimiques (sauf enzymologie)	79
<u>Tableau 7</u> : Alpha D mannosidase dans la mannosidose	81 - 85
<u>Tableau 8</u> : Taux d'alpha mannosidase extra et intracellulaire de diverses sources necessaire à la diminution de 50 % des substneces de surcharge (MERSMANN 1978(200))....	92
<u>Tableau 9</u> : Détermination d'activité des hydrolases acides dans les leucocytes de Saliha B.	114
<u>Tableau 10</u> : Activité de l'alpha D mannosidase dans le sérum Technique de HUMBEL	118
<u>Tableau 11</u> : Activité de l'alpha D mannosidase dans le sérum. Technique de MASSON	119
<u>Tableau 12</u> : Alpha D mannosidase dans les leucocytes (concentration S = 7,8 mM)	121
<u>Tableau 13</u> : Etude de l'alpha D mannosidase dans les leucocytes (S) = 1 et 10 mM - pH = 3,8	122
<u>Tableau 14</u> : Influence de la concentration en substrat sur l'activité de l'alpha D mannosidase dans les fibroblastes	132
<u>Tableau 15</u> : Activité de l'alpha D mannosidase dans les cellules amniotiques en cultre	142
<u>Tableau 16</u> : Resultats de la purification de l'alpha D mannosidase placentaire normale	155
<u>Tableau 17</u> : Action des effecteurs métalliques (sauf Co++ et Zn++) sur les fractions A et B purifiées	165
<u>Tableau 18</u> : Purification de l'alpha D mannosidase placentaire du foetus B.	170

<u>Tableau 19</u>	: Action des effecteurs métalliques sauf Co^{++} et Zn^{++} sur l' α D mannosidase placentaire (purification au stade de la fraction III)	180
<u>Tableau 20</u>	: Etude des hydrolases acides dans l'homogenat de foie du Foetus B.	183

REPERTOIRE DES FIGURES

PAGES

<u>Figure 1</u>	: Biosynthèse des glycoprotéines. Rôle du Dolichol selon WAECHTER et LENNARZ 1976	15
<u>Figure 2</u>	: Représentation de la synthèse des glycoprotéines d'après HEMMING 1977	17
<u>Figure 3</u>	: Catabolisme des glycoprotéines	20
<u>Figure 4</u>	: Hypothèse de sécrétion recaptation. Cycle d'une enzyme lysosomiale. Selon NEUFELD 1977	23
<u>Figure 5</u>	: Le fonctionnement de l'appareil lysosomal. D'après DE DUVE (58)	48
<u>Figure 6</u>	: Enquête génétique - Famille B.	60
<u>Figure 7</u>	: MANNOSIDOSE : Les oligosaccharides urinaires (STRECKER 1977)	78
<u>Figure 8</u>	: Choix du tampon pour l'étude de l'alpha D- mannosidase acide.	106
<u>Figure 9</u>	: Détermination de l'alpha D-mannosidase sur les cellules amniotiques cultivées avec le substrat MU	109
<u>Figure 10</u>	: Etude de l'alpha D-mannosidase dans le sérum. Influence du pH	117
<u>Figure 11</u>	: Activité de l'alpha D-mannosidase dans les leucocytes. Influence du pH	123
<u>Figure 12</u>	: Activité de l'alpha D-mannosidase dans les leucocytes d'un témoin. Influence de la concentration en substrat à pH 3,8	125
<u>Figure 13</u>	: Activité de l'alpha D mannosidase dans les leucocytes des malades. Influence de la concentration en substrat à pH 3,8.....	126
<u>Figure 14</u>	: Alpha D-mannosidase : influence des ions Co ⁺⁺ (5 mM) et Zn ⁺⁺ (1,0 mM) en fonction de la concen- tration en substrat à pH 3,8 dans les leucocytes d'un malade et d'un témoin.	127
<u>Figure 15</u>	: Activité de l'alpha D-mannosidase dans les fibro- blastes. Influence du pH à 2 concentrations en substrat	130
<u>Figure 16</u>	: Activité de l'alpha D mannosidase dans les fibro- blastes - Influence de la concentration en substrat pH 3,6.	131
<u>Figure 17</u>	: Influence des ions Co ⁺⁺ (5 mM) et Zn ⁺⁺ (2,5 mM) sur la courbe de pH de l'alpha D mannosidase dans les fibroblastes	134

<u>Figure 18</u> :	Influence du mannose sur l'alpha D-Mannosidase secrétée dans le milieu de culture des fibroblastes.....	139
<u>Figure 19</u> :	Etude de l'Influence du pH sur l'activité de l'alpha D-mannosidase dans le liquide amniotique	141
<u>Figure 20</u> :	Influence du pH sur l'activité de l'alpha D-mannosidase des cellules amniotiques	144
<u>Figure 21</u> :	Influence de la concentration en substrat sur l'alpha D-mannosidase des cellules amniotiques en culture à pH 3,6	145
<u>Figure 22</u> :	Diagramme d'élution de la colonne de Sephadex G 150	149
<u>Figure 23</u> :	Diagramme d'élution de la colonne de DE 52	151
<u>Figure 24</u> :	Diagramme d'élution de la fraction A après passage sur colonne de Sephadex G 200	153
<u>Figure 25</u> :	Diagramme d'élution de la fraction B après passage sur colonne de Sephadex G 200	154
<u>Figure 26</u> :	Influence de la concentration en substrat sur l'alpha D-mannosidase acide placentaire. Fraction A. Représentation de HILL	158
<u>Figure 27</u> :	Influence du mannose sur la Km de l'alpha D-mannosidase acide placentaire. Représentation de Lineweaver et Burk Fraction A purifiée	159
<u>Figure 28</u> :	Détermination de la constante d'inhibition du mannose Fraction A de l'alpha D-mannosidase acide placentaire	160
<u>Figure 29</u> :	Action des ions Co ⁺⁺ et Zn ⁺⁺ pH 4 sur les fractions A et B de l'alpha D-mannosidase placentaire	162
<u>Figure 30</u> :	Influence des ions Co ⁺⁺ (5mM) et Zn ⁺⁺ (1 mM) sur la courbe de pH des fractions A et B de l'alpha D mannosidase acide placentaire	163
<u>Figure 31</u> :	Determination des points isoélectriques de la fraction B Focalisation électrique	168
<u>Figure 32</u> :	Etude de l'alpha D mannosidase dans le placenta. Influence du pH	172
<u>Figure 33</u> :	Alpha D mannosidase - Homogenat placenta B. Influence de la concentration en substrat à pH 4	174
<u>Figure 34</u> :	Alpha D mannosidase dans l'homogenat de placenta B. Influence de la concentration en substrat. Représentation de Lineweaver et Burk	175

<u>Figure 35</u> : L'alpha D mannosidase dans l'homogenat de placenta B. Influence de la concentration en substrat à pH 4,0 Représentation de HILL	176
<u>Figure 36</u> : Alpha D mannosidase dans l'homogenat du placenta B. Action du mannose en fonction de la concentration en substrat	177
<u>Figure 37</u> : Fraction V. Placenta B. Influence des ions Co^{++} 5 mM et Zn^{++} 1 mM sur l'activité de l'alpha D mannosidase à pH 4 pour différentes concentrations en substrat	179
<u>Figure 38</u> : Activité de l'alpha D mannosidase dans le foie. Influence de la concentration en substrat à pH 3,8	184
<u>Figure 39</u> : Activité de l'alpha D mannosidase dans le foie Influence du pH	186
<u>Figure 40</u> : Foie témoin. Influence de la concentration en substrat sur l'alpha D mannosidase acide	187
<u>Figure 41</u> : Foie foetus B. Influence de la concentration en substrat sur l'alpha D mannosidase acide	188
<u>Figure 42</u> : Alpha D mannosidase dans l'homogenat de foie du foetus B. Influence de la concentration en substrat à pH 3,8 Représentation de Lineweaver et Burk.	190
<u>Figure 43</u> : Homogenat de foie. Influence de la concentration en substrat à pH 3,8. Représentation de HILL	191
<u>Figure 44</u> : Influence des ions Co^{++} et Zn^{++} sur l'alpha D mannosidase acide hépatique	195
<u>Figure 45</u> : Action du mannose sur l'activité de l'alpha D mannosidase acide d'un homogénat de foie témoin	196
<u>Figure 46</u> : Action du mannose sur l'activité de l'alpha D mannosidase acide de l'homogénat de rein du foetus B.	197

TABLE DES MATIERES

	PAGES
(Signification des abréviations employées)	1
<u>INTRODUCTION</u>	2
<u>PREMIERE PARTIE : LA MANNOSIDASE NORMALE ET MUTANTE DANS LE</u> <u>CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES</u>	4
INDIVIDUALISATION DE LA MANNOSIDOSE AU SEIN DES GLYCOPROTEINOSES..	5
- individualisation de la maladie	
- classification des glycoprotéinoses	
I - <u>LA MANNOSIDASE ET LE METABOLISME DES GLYCOPROTEINES</u>	9
I.1. Les glycoprotéines	9
I.1.1. Définition	9
I.1.2. Localisation et rôle des glycoprotéines dans l'organisme..	9
I.1.3. Structure	10
I.1.4. Biosynthèse des glycoprotéines	14
I.1.5. Catabolisme des glycoprotéines	16
I.2. La mannosidase	21
I.2.1. Caractères généraux des enzymes lysosomiales	21
I.2.2. L'alpha mannosidase (E.C.3.2.1.24)	28
- les alpha mannosidases végétales	28
- les alpha mannosidases bactériennes et fungiques	29
- les alpha mannosidases animales	30
- les alpha mannosidases humaines	32
I.3. Les lysosomes	46
I.3.1. La digestion lysosomiale	46
I.3.2. L'hétérogénéité des lysosomes	49
II - <u>LA MANNOSIDOSE - ANOMALIE DU CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES..</u>	50
II.1. Les thesaurismoses lysosomiales	50
II.2. La mannosidose	54

II.2.1. Les cas faisant l'objet de notre travail	54
II.2.2. Revue des cas de la littérature	61
- clinique	61
- les éléments radiologiques	70
- cytologie hématologique	71
- anatomo-pathologie	71
- mise en évidence des substances de surcharge dans la mannosidose	74
- l'anomalie enzymatique	80
II.2.3. La génétique	86
II.2.4. Le diagnostic	87
II.2.5. La thérapeutique	88
II.2.6. La mannosidose animale	96

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE L'ALPHA D MANNOSIDASE ACIDE CHEZ DES SUJETS
SAINS OU ATTEINTS DE MANNOSIDOSE - APPLICATION AU
DIAGNOSTIC PRENATAL 99

I - <u>MATERIEL D'ETUDE ET METHODES</u>	100
I.1. Les malades	100
I.2. Matériel biologique	100
I.3. Méthodes	104
I.3.1. Etude des oligosaccharides dans l'urine par la technique de screening de HUMBEL	104
I.3.2. Détermination de l'activité enzymatique de l'alpha D mannosidase	104
I.3.3. Détermination d'activité des autres hydrolases acides.....	110
I.3.4. Mesure du taux de protéines	111
I.3.5. Electrophorèse de l'alpha D mannosidase	111
I.3.6. Focalisation électrique sur plaque	111
I.3.7. Focalisation électrique en colonne	113
II - <u>RESULTATS</u>	114
II.1. Le diagnostic à l'origine de l'étude	114

II.2. Etude de l'alpha D mannosidase dans le sérum	116
II.3. Etude de l'alpha D mannosidase dans les leucocytes	121
II.4. Etude de l'alpha D mannosidase dans les fibroblastes cutanés	129
II.5. Etude de l'alpha D mannosidase secrétée dans le milieu de culture des fibroblastes	137
II.6. Diagnostic prénatal	140
II.7. Etude de l'alpha D mannosidase acide placentaire	146
a) l'enzyme placentaire normale	146
b) l'enzyme placentaire du foetus atteint de mannosidose ...	169
II.8. Etude de l'alpha D mannosidase acide du foie foetal	183
II.9. Etude de l'alpha D mannosidase dans d'autres organes du foetus	198
Photos	199
III - <u>DISCUSSION</u>	201
III.1. Protocole proposé pour établir le diagnostic d'une mannosidose et la mise en évidence de son phénotype.....	201
a) l'enzyme normale.....	201
b) l'enzyme mutante	202
c) protocole diagnostique d'une mannosidose	204
d) étude comparative des phénotypes	205
III.2. Le diagnostic prénatal de la mannosidose	206
a) le problème général de la mesure d'activité enzymatique. dans les cellules en culture	206
b) les problèmes particuliers au type d'anomalie enzymatique dans la mannosidose	208
III.3. Discussion sur la nature de la mutation	210
a) hypothèse sur la mutation à l'origine du phénotype étudié	210
b) sécrétion par les fibroblastes mutants d'enzyme normale dans le milieu de culture	212
c) Implication thérapeutique	213
<u>CONCLUSION</u>	215

RESUME	218
BIBLIOGRAPHIE	222
REPERTOIRE DES TABLEAUX	266
REPERTOIRE DES FIGURES	268
TABLE DES MATIERES	271



Association Amicale des Etudiants en Pharmacie de Lyon
8, avenue Rockefeller - 69008 LYON - Tél. (78) 74-40-37